

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Marcos Eduardo Lamas de Albuquerque



INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS ORIGINADOS DE MONÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS COM O PARASITO *LEISHMANIA AMAZONENSIS* EM MICROAMBIENTES NORMÓXICO E HIPÓXICO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) MARCOS EDUARDO LAMAS DE ALBUQUERQUE e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação a ser apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção de título de Mestre em Parasitologia

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Selma Giorgio".

Orientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio

2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA _____
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 68113
PROC 201223106
C _____ D X
PREÇO 1100
DATA 29/05/06
Nº CPD _____

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

AI158i

Albuquerque, Marcos Eduardo Lamas de
Infecção de macrófagos originados de monócitos primários humanos com o parasito Leishmania amazonensis em microambientes normóxico e hipóxico. - Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Selma Giorgio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania*. 2. Fator de necrose de tumor 3. Macrófagos. 4. Hipoxia celular. I. Giorgio, Selma. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: *Leishmania amazonensis* infection in macrophages derived from primary monocytes, in normoxic and hypoxic microenvironments.

Palavras-chave em inglês: *Leishmania*; Tumor necrosis factor; Macrophages; Cell hypoxia.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

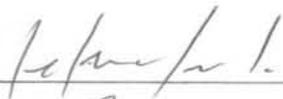
Banca examinadora: Selma Giorgio, Fabio Trindade Maranhão Costa, Marcelo Brocchi, Ana Maria Aparecida Guaraldo, Fernanda Ramos Gadelha.

Data da defesa: 31/01/2006.

Data da Defesa: 31/01/2006

Banca Examinadora

Profa. Dra. Selma Giorgio



Prof. Dr. Fábio T. M. Costa



Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Profã. Dr. Ana Maria A. Guaraldo

Profã. Dr. Fernanda R. Gadelha

Ficha Catalográfica.....	ii
Banca Examinadora.....	iii
Índice.....	iv
Agradecimentos.....	vi
Dedicatória.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1-Introdução.....	01
1.1 O Parasito.....	01
1.2 A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	02
1.3 A Patologia da LTA.....	04
1.4 Controle, Diagnóstico, e Tratamento da LTA.....	05
1.5 A Resposta Imune do Hospedeiro.....	07
1.6 Os Macrófagos.....	09
1.7 Os Efeitos da Hipóxia na Resposta Imune.....	10
2- Objetivos.....	14
3- Materiais e Métodos.....	15
3.1 Animais.....	16
3.2 Meio de cultura.....	16
3.3 Obtenção e Manutenção do Parasito.....	16
3.4 Condições de Microambiente Hipóxico.....	17
3.5 Obtenção e Cultivo de Macrófagos Primários Humanos a Partir de Monócitos de Sangue Periférico.....	17
3.5.1 Procedimento de Coleta de Sangue Periférico.....	17
3.5.2 Separação dos monócitos de Sangue Periférico com Histopaque.....	18
3.5.3 Cultivo de Macrófagos Humanos Primários.....	18
3.6 Testes de Infecção e Fagocitose de Macrófagos Primários Humanos com <i>L. amazonensis</i>	19
3.6.1 Infecção com <i>L. amazonensis</i>	19
3.6.2 Cultivo de Macrófagos Primários Humanos com “Beads”.....	19
3.6.3 Infecção de Macrófagos em Ambiente Hipóxico.....	20

3.6.4 Avaliação do Meio.....	23
3.7 Teste de Viabilidade Celular.....	23
3.8 Determinação da Produção do TNF- α	24
3.8.1 Obtenção de Sobrenadantes de Culturas de Macrófagos.....	24
3.8.2 Teste de Detecção de TNF- α	25
3.9 Análise Estatística	26
4- Resultados.....	27
4.1 Obtenção de Macrófagos Humanos.....	27
4.2 Infecção de Macrófagos Humanos com <i>L. amazonensis</i>	29
4.3 Infecção de Macrófagos Humanos em Hipóxia.....	33
4.4. Avaliação da Viabilidade do Meio de cultura Após Hipóxia.....	43
4.5. Viabilidade de Macrófagos em Hipóxia.....	45
4.6-Produção de TNF- α por Macrófagos em Hipóxia.....	46
5- Discussão.....	48
6- Conclusões.....	57
7- Referências Bibliográficas.....	58

Agradecimentos

À Professora Selma Giorgio pela orientação, pelo profissionalismo, dedicação, paciência e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Aos professores do Departamento de Parasitologia pelos valiosos ensinamentos e pela ajuda nos momentos em que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia pelo auxílio e pela dedicação durante a realização deste trabalho.

À professora Urara Kawazoe pelas sugestões oferecidas e pelo apoio dado durante todos os momentos do meu trabalho.

À professoras Ana Maria A. Guaraldo, Silmara Marques Allegretti, e aos professores Fábio T. M. Costa, Marcelo Brocchi e Odair Benedito Ribeiro pelas importantes sugestões dadas a este trabalho.

Aos amigos do laboratório, Adriana, Diana, Letícia, Maira, Wagner, pela paciência e pelo apoio.

Aos amigos Alessandro, Brenno, Daniel e Rafael que literalmente “deram o sangue” para realização deste projeto.

**Dedico este trabalho ao meu pai
Walter, a minha esposa Sandra e ao meu
filho Diogo por acreditarem em mim e pelo
apoio fundamental pra a realização deste
projeto.**

Lista de Abreviaturas

CFU	Fator de formação de colônia
CSF	Fator de estimulação de colônia
CFU-GM	Unidade de formação de colônia de granulócitos/macrófagos
GM-CSF	Fator de estimulação de colônia da granulócitos/macrófagos
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia um-alfa
HSP-70	Proteína de choque térmico de 70 kilodaltons
INF- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo de origem bacteriana
MHP	Macrófagos humanos primários
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NO	Óxido nítrico
PBS	Salina em tampão fosfato
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
Th1	Linfócito tipo “helper” 1
Th2	Linfócito tipo “helper” 2
TNF	Fator de necrose tumoral alfa

Resumo

A leishmaniose tegumentar é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania* que acomete preferencialmente a pele e/ou as mucosas e caracteriza-se pelo aparecimento de lesões ulcerosas. Histologicamente, esta lesão caracteriza-se pela desintegração da epiderme e da membrana basal, com grande incidência de histiócitos, linfócitos, granulomas e proliferação de parasitos. Como consequência, a região lesada apresenta redistribuição de vasos sanguíneos, e dificuldades na difusão de oxigênio, resultando em microambiente hipóxico. Macrófagos se adaptam a hipóxia, alterando seu metabolismo, produção de linfocinas e atividade fagocítica. No presente trabalho comparamos os efeitos da hipóxia (6% O₂) e da normóxia (21% O₂) na infecção *in vitro* de macrófagos humanos obtidos de monócitos de sangue periférico com o parasito *Leishmania amazonensis*. Culturas de macrófagos humanos expostos a hipóxia antes da infecção com *L. amazonensis* mostraram redução na porcentagem de células infectadas quando comparadas com culturas de macrófagos humanos que permaneceram em normóxia. Nós também investigamos se a hipóxia estaria inviabilizando a sobrevivência dos macrófagos (teste do MTT) e induzindo a produção da linfocina TNF- α (boiensaiio com células L929). Macrófagos humanos submetidos à hipóxia não mostraram diferenças significativas em relação à viabilidade quando comparados aos macrófagos que permaneceram em ambiente normóxico. Culturas de macrófagos humanos estimulados com LPS e submetidos a períodos de hipóxia produziram mais TNF- α do que culturas de macrófagos estimulados com LPS que permaneceram em normóxia. Porém quando infectados com *L. amazonensis*, macrófagos estimulados com LPS em hipóxia mostraram produção significativamente menor de TNF- α quando comparados a macrófagos não infectados e estimulados por LPS, em ambiente hipóxico. Verificamos também que a

produção de TNF- α nas culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, estimuladas com LPS, em hipóxia foi similar a produção de TNF- α dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, estimulados com LPS, mas que permaneceram em normóxia.

Nossos resultados indicam que hipóxia altera a susceptibilidade de macrófagos humanos obtidos de monócitos de sangue periférico para a infecção com *L. amazonensis*, e que a produção de TNF- α não está envolvida no mecanismo pelo qual estas células controlam a carga parasitária.

Abstract

The tegumentary leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoa *Leishmania* which attacks skin and/or mucosal tissues. The lesions are histologically characterized by degeneration of epidermal and the basal membranes with infiltration of histiocytes, lymphocytes, granuloma and parasite proliferation. Cutaneous lesions are associated with rearrangement of the blood vessels and decreased oxygen diffusion, resulting in a hypoxic microenvironment. Macrophages adapt to hypoxia altering their metabolism, lymphocytes production and phagocytosis activity. In the present study we have compared the effect of hypoxia (6% O₂) with normoxia (21% O₂) in human macrophages, derived from peripheral blood monocytes, infected with *Leishmania amazonensis*. Human macrophages exposed to hypoxia before infection with *L. amazonensis* showed a reduction of the percentage of infected cells. Cell viability was tested by MTT and TNF- α production was detected by bioassay using cell line L929. Human macrophages exposed to hypoxia showed similar viability when compared with human macrophages in normoxia. Human macrophages stimulated with LPS and exposed to hypoxia increased TNF- α production when compared with macrophage stimulated by LPS cultured in normoxia. However, macrophage, infected with *L. amazonensis* stimulated with LPS and exposed to hypoxia showed a reduction in TNF- α production when compared with non infected macrophage, stimulated with LPS and exposed to hypoxia. We also observed that TNF- α production in *L. amazonensis* infected macrophages stimulated with LPS and exposed to hypoxia was similar to TNF- α production of infected macrophages stimulated with LPS, in normoxia.

Our data indicated that hypoxia can alter human macrophages susceptibility to *L. amazonensis* infection and no correlation between TNF- α production and control of parasite infection in these cells under hypoxia conditions.

1-Introdução

1.1 O Parasito

O gênero *Leishmania* foi criado por Ross em 1903 a partir das observações do parasito feitas por Cunnigham (1885), Leishman (1900) e Donavan (1903) (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

No ciclo de vida do parasito existem duas formas morfológicas: os promastigotas e os amastigotas. Os promastigotas são formas alongadas com flagelo na região anterior, medem 16,0 a 40,0 μm de comprimento e 1,5 a 3,0 μm de largura, incluindo o flagelo, que geralmente é maior do que o corpo. Reproduzem-se por divisão binária no hospedeiro invertebrado, produzindo formas infectantes denominadas promastigotas metacíclicos. Estes parasitas migram para a probólide do inseto e no momento do repasto sanguíneo são inoculados no tecido celular subcutâneo do hospedeiro vertebrado. No vertebrado são fagocitados por macrófagos presentes nos tecidos (histiócitos) e transformam-se na forma amastigota. Os amastigotas são esféricos com um flagelo interno rudimentar (pequena invaginação na superfície do parasito). Estes medem de 3,0 a 6,5 μm , e reproduzem-se por divisão binária dentro dos macrófagos, causam lise celular, e infectam outros macrófagos. No repasto sanguíneo do inseto vetor em um vertebrado infectado ocorre a ingestão das formas amastigotas, que se transformarão em promastigotas em seu intestino, fechando o ciclo evolutivo do parasito (HEPBURN 2000; HANDMAN, 2001). São conhecidas aproximadamente 21 espécies do protozoário, que podem se hospedar em cerca de 30 espécies de vetores (CUNINGAM, 2002).

O vetor da doença é um díptero da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae pertencente aos gêneros: *Phlebotomus*, prevalente na África, Europa e Ásia e *Lutzomyia*, prevalente nas Américas. As fêmeas são hematófagas e se contaminam ao ingerir

macrófagos do hospedeiro infectado com formas amastigotas do parasito. No Brasil, espécies do gênero *Lutzomyia* estão presentes em todas as regiões do país, onde recebem nomes populares, tais como, “cangalha”, “mosquito-palha”, “birigui” e “tatuíra”. Estes insetos são morfológicamente menores que os mosquitos comuns, apresentam-se muito pilosos e tem coloração clara. As fêmeas necessitam de sangue para completarem o ciclo reprodutivo e costumam exercer a hematofagia no período noturno (CUNINGAM, 2002; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Alguns mamíferos próximos ao homem, que fazem parte do ciclo de vida do parasito, são reconhecidos como reservatórios de *Leishmania*, tais como, cães, roedores, cavalos, gambás, macacos e tamanduás (HEPBURN, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Neste trabalho, utilizamos formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Esta espécie de *Leishmania*, provoca a forma tegumentar ou cutânea da infecção.

1.2 A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma parasitose de ciclo heteroxênico que acomete preferencialmente a pele e/ou as mucosas e caracteriza-se pelo aparecimento de lesões ulcerosas. A LTA é endêmica e com incidência alta em regiões tropicais da África, Américas, Índia, Mediterrâneo e Sudeste Asiático, totalizando 1,5 milhões de pessoas infectadas. Países como Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru apresentam 90% dos casos relatados da doença (HEPBURN, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003). No Brasil, estima-se o aparecimento de aproximadamente 35.000 novos casos clínicos por ano em todas as regiões do país (HEPBURN, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A LTA caracteriza-se pelo aparecimento de lesão cutânea de aspecto pápulo-vesiculoso que eventualmente pode disseminar-se para outras áreas do corpo. No caso de disseminação cutânea, denomina-se a doença de LCD (Leishmaniose Cutânea Difusa) e no caso de invasão de mucosa nasofaríngea, Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM). Uma outra característica importante da LTA é a sua reativação em pacientes imunossuprimidos devido à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A gravidade e a incidência de LTA levaram a Organização Mundial de Saúde a incluir esta doença entre as seis mais importantes endemias causadas por parasitos ([www. who. int/ health topics/leishmaniasis](http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis)).

No Brasil, casos clínicos de LTA eram conhecidos por Cerqueira desde 1885 e sua forma epidêmica foi relatada em 1907 entre os trabalhadores da construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil (HEPBURN, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003; HERWALDT, 1999).

Devido à grande diversidade de gêneros do protozoário, foi proposta uma classificação por Laison & Shaw (1987) que divide os subgêneros em grandes “complexos”, dos quais destacamos os seguintes, de interesse parasitológico no Brasil por causarem LTA, os complexos, *mexicana* (subgênero *Leishmania*) e *braziliensis* (subgênero *Viannia*). Dentro destes complexos também foi proposta a classificação das espécies, às quais destacamos, devido à patogenia em humanos: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) brasiliensis* (LAISON & SHAW, 1992).

Ainda podemos citar duas espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *donovani*, as *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, que, embora não provoquem a LTA, são responsáveis pela forma visceral e geralmente fatal da

leishmaniose também conhecida como calazar (HERWALDT, 1999; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

1.3 A Patologia da LTA

A lesão cutânea aguda causada por *Leishmania* se inicia após a inoculação dos parasitos, que são fagocitados por macrófagos e se tornam hospedeiros das formas amastigotas. As lesões podem ser pápulas, nódulos ou placas que formam crostas ou úlceras. Após um período de incubação que varia entre 1 e 12 semanas observa-se no local da picada a primeira manifestação clínica que é uma pequena pápula indolor que pode permanecer estacionária ou evolui para um nódulo dérmico, conhecido como histioma, que se caracteriza por apresentar uma massa dérmica contendo um infiltrado de macrófagos e linfócitos. Histologicamente, esta lesão se caracteriza por hipertrofia do estrato córneo, com acúmulo de histócitos onde os parasitos se multiplicam. Este nódulo desenvolve necrose central que resulta na desintegração da epiderme e da membrana basal, formando uma lesão ulcerosa circular e crostosa (MEHREGAN et al., 1999 e GHERSETICH et al., 1999). O infiltrado dérmico nesse estágio se estende visivelmente e a área de necrose aumenta desenvolvendo lesões características de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. guyanensis*. Após a perda da crosta superior, observa-se uma elevação das bordas cujo fundo é granuloso, repleto de exudado purulento, com grande incidência de histiócitos, linfócitos, e granulomas. Nas bordas da lesão é grande o número de formas amastigotas (MEHREGAN et al., 1999; GHERSETICH et al., 1999; HANDMAN, 2001).

A lesão causada por *L. amazonensis* cura-se espontaneamente e é susceptível ao tratamento. Entretanto, alguns pacientes desenvolvem a forma difusa da doença (Leishmaniose Cutânea Difusa, LCD), na qual o parasito migra por vasos linfáticos, provocando o aparecimento de lesões por toda a pele e formando metástases (HANDMAN,

2001; GONTIJO & CARVALHO 2003). Na LCD não há resposta aos tratamentos conhecidos e está associada à deficiência da resposta imune celular do paciente frente aos antígenos do parasito. Na LCD é comum também o aparecimento de lesões não-ulcerosas com focos necróticos e granulomas, principalmente no rosto e membros (MEHREGAN et al., 1999; HANDMAN, 2001; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Todas as lesões, cutâneas, mucosas e cutâneas difusas apresentam redistribuição focal de vasos sanguíneos, causando dificuldades na difusão de oxigênio no local (isquemia) e resultando em um ambiente de pouco aporte de oxigênio ou hipóxico. A hipóxia tecidual deve prejudicar o efeito das drogas e alterar a cicatrização destas lesões (MEHREGAN et al., 1999; LAHAT, et al., 2003 e COLHONE et al., 2004).

1.4. Controle, Diagnóstico e Tratamento da LTA

Por ser uma zoonose primitiva de florestas, a LTA resiste a qualquer medida preventiva aplicável às doenças transmitidas por vetores devido à impossibilidade atuação na fonte da infecção silvestre. Os resultados, ainda preliminares, com imunoterapia e imunoprofilaxia representam possibilidades profiláticas promissoras. (HANDMAN, 2001; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O diagnóstico parasitológico pode ser feito diretamente com a demonstração das formas amastigotas obtidas da lesão por escarnificação, aspiração ou biópsia da borda, corado por Giemsa ou Leishman (MEHREGAN et al., 1999; HANDMAN, 2001). O diagnóstico imunológico pode ser feito pelo Intradermorreação de Montenegro, que consiste de injeção intradérmica de solução de antígeno padronizado no antebraço. É considerado positivo o paciente que após 48 ou 72 horas apresenta endureção maior ou igual a 5 mm na região aplicada. O teste detecta hipersensibilidade tardia e é normalmente negativo nas formas cutâneas difusas (LCD) ou em pacientes imunodeprimidos, porém, é

de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA e nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas (MEHREGAN et al., 1999; GHERETICH et al., 1999; HANDMAN, 2001). Outros métodos utilizados para a detecção de LTA são as reações de ELISA, o diagnóstico histológico e a reação em cadeia de polimerase (PCR) que permite detectar quantidades muito pequenas do DNA do parasito (MEHREGAN et al., 1999; GHERETICH et al., 1999; HANDMAN, 2001).

O tratamento da doença em humanos é feito administrando-se antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumine (Glucantime) ou o stibogluconato de sódio (Pentostam). Seus efeitos colaterais mais freqüentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço na região de aplicação. Cardio, hepato e nefrotoxicidade também são observadas, limitando o uso dessas drogas, especialmente em pacientes idosos e, por ser abortiva, a droga é vetada em gestantes. O antibiótico, anfotericina B, de reconhecida ação leishmanicida, é normalmente a opção quando o antimonial se torna proibitivo ou inoperante. Apesar de eficaz para lesões cutâneas, a anfotericina B apresenta sérios efeitos colaterais como náuseas, vômitos, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. O uso endovenoso e os quadros de cardio e nefrotoxicidade impedem o seu uso fora de ambiente hospitalar. (www.who.int/tdr/; HERWALD, 1999; HEPBRUN, 2001).

1.5 A Resposta Imune do Hospedeiro

Após a infecção, os parasitos necessitam se reproduzir rapidamente, e de preferência, em macrófagos quiescentes ou em monócitos recém chegados ao tecido infectado. Para isso, usam mecanismos de evasão ou escape que, por exemplo, inibam o “burst” respiratório dos macrófagos. O parasita também induz alterações na resposta imune do hospedeiro, como modificações na produção de citocinas, inibição da apresentação de antígenos e estimulação de linfócitos do tipo T (CD4+) helper Th2 (MAUEL, 1996; BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998; GHERSETICH et al., 1999).

Há, pelo menos, duas respostas imunes celulares envolvidas no controle/susceptibilidade à infecção com *Leishmania*, muito estudadas nos modelos murinos da leishmaniose cutânea. No processo de imunidade celular protetora, o linfócito T do tipo Th1 produz e libera IL-2 e IFN- γ , citocinas que recrutam células (neutrófilos e monócitos) para local de infecção e que também ativam macrófagos e células NK (Natural Killer). Os macrófagos por sua vez liberam citocinas como o TNF- α e IL-1 que aumentam a atividade microbida dos próprios macrófagos, ou IL-12 que estimula linfócitos Th1 a produzirem novas citocinas (HERWALD, 1999 e HEPBRUN, 2000). As citocinas TNF- α e IL-1, além de estimularem ação microbida dos macrófagos, recrutam mais linfócitos para a região de inflamação. Esta inflamação passa a apresentar características de Hipersensibilidade do tipo Tardia, em que ocorre persistência dos agentes infecciosos no interior dos macrófagos, formação de granulomas, destruição tissular, redistribuição de vasos sanguíneos por estímulo dos próprios macrófagos e formação de ambiente com pouca oxigenação. Vários estudos sugerem que o TNF- α é um dos principais fatores de estímulo para que macrófagos eliminem parasitos intracelulares como *Leishmania* (MAUEL, 1996).

Estudos de Liew et al. (1990), demonstraram que camundongos CBA/T6T6 infectados com *L. amazonensis* e tratados com anticorpo anti-TNF- α têm lesões mais graves que aquelas de animais não tratados com o mesmo anticorpo. Experimentos realizados com culturas de células também indicam um papel importante do TNF- α na redução da infecção. Macrófagos peritoneais murinos tratados com TNF- α e LPS e infectados com *L. major* foram capazes de destruir os parasitos intracelulares. Entretanto, a presença de LPS foi fundamental para a ativação dos mecanismos leishmanicidas (LIEW et al., 1990). Uma interação sinérgica de TNF- α com INF- γ reduzindo a carga parasitária de macrófagos infectados com *L. major* foi demonstrada por Bogdan et al. (1990). A associação de INF- γ com IL-4 não mostrou efeitos nas mesmas células infectadas com o parasito (BOGDAN et al., 1990). A produção de TNF- α durante o processo de controle da infecção pode estar associada ao ambiente hipóxico presente nas lesões (LEEPER-WOODFORD et al., 1999; LAHAT et al., 2003 e COLHONE et al., 2004).

No processo de imunidade celular relacionado à susceptibilidade na infecção com *Leishmania*, estão envolvidos os linfócitos T do tipo Th2. Apesar do padrão de produção das citocinas ainda não ser completamente entendido, sabe-se que, dependendo do estímulo antigênico, linfócitos Th podem se diferenciar em linfócitos Th2 que produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e provocam um efeito supressor da capacidade de defesa contra o parasito. (MEHREGAN, 1999; HANDMAN, 2002; GHERSETICH, 1999; HERVALDT, 1999). Este efeito está ligado à ação da IL-4 que inibe a ativação dos macrófagos por INF- γ , provocando uma diminuição na produção de TNF- α e IL-1. Os linfócitos Th2 produzem IL-10 que está associada à inibição de proteínas coestimulatórias da membrana de macrófagos e de células dendríticas. (HO et al., 1992). Apesar de bastante estudadas em

modelos murinos e culturas de células murinas, as respostas imunes e a dicotomia Th1/Th2 são menos avaliadas em pacientes e em células de origem humana.

1.6. Os Macrófagos

Macrófagos são células do sistema fagocitário mononuclear, originadas de células tronco hematocitopoéticas presentes na medula óssea que se diferenciam em células formadoras de colônia CFU (*colony-forming unit*). Estas células dão origem a quatro linhagens básicas do sangue: eritróide, megacariocítica, linfóide e mielóide. As CFU, sob a influência de citocinas produzidas por células maduras na medula óssea, como por exemplo, CSF (*colony stimulatory factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage stimulatory factor*) e das interleucinas IL 1, IL3, IL4, IL5 e IL6, dão origem às células precursoras mielóides, CFU-GM (*colony-forming unit granulocyte-macrophage*) e posteriormente a CFU-M (*colony-forming unit macrophage*), que originam as células precursoras dos macrófagos presentes na corrente sanguínea, os monócitos (KLEINERMAN, et al., 1988; SCHONLAU et al, 2003).

Os monócitos correspondem a 1-6% das células brancas do sangue, onde são as maiores células brancas presentes, com diâmetro variando entre 12 e 15 μm e apresentando um grande núcleo riniforme, bilobado e central. Estas células têm a capacidade de migrarem dos vasos sanguíneos e se instalarem nos tecidos. A mudança de ambiente provoca um estímulo que resulta em diferenciação celular, gerando células fagocíticas chamadas macrófagos (KELLEY et al., 1988; LEWIS et al, 1999). Estruturalmente, os macrófagos apresentam uma cromatina frouxa, com grânulos dispersos no núcleo e maior quantidade de citoplasma se comparado aos monócitos. No citoplasma, o complexo de Golgi é muito desenvolvido devido à grande produção de fagolisossomos. O citoplasma é ondulado, com presença de muitas fibras protéicas do citoesqueleto responsáveis pela

formação de pseudópodes que participam das funções fagocíticas dos macrófagos (LEWIS et al, 1999; COX et al., 1999). Em mamíferos, cada tecido apresenta características microambientais próprias. Por exemplo, enquanto o peritônio é altamente anaeróbico, os alvéolos pulmonares são muito oxigenados e assim aeróbicos. Em cada tipo de microambiente tissular, o processo de diferenciação do macrófago (adaptação) pode gerar mudanças fenotípicas que diferenciam um macrófago de outro, embora sua função fagocítica permaneça a mesma (LEEPER-WOODFORD et al., 1999).

Os macrófagos quando ativados, principalmente por lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS) ou TNF- α , apresentam no interior de seus fagolisossomos secundários, além de enzimas hidrolíticas, uma série de metabólitos oxigenados como, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻), oxigênio singlet (1/2 O₂), radical hidroxila (OH[•]), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO[•]). (HO et al., 1992; WEINBERG et al., 1995; GIORGIO et al., 1996; GANTT et al., 2001). Para a produção destes metabólitos tóxicos, durante o processo de fagocitose, ocorre um grande aumento no consumo de oxigênio pelos macrófagos, conhecido como “burst” respiratório ou explosão respiratória. Estes fagócitos também sintetizam óxido nítrico a partir de L-arginina pela enzima NO-sintetase induzida (iNOS), um importante radical livre microbicida que reage com o superóxido gerando peroxinitrito, outro agente citotóxico (WEINBERG et al., 1995). Protozoários como *Leishmania* possuem mecanismos de evasão destes metabólitos, tal como, a capacidade de inibir da expressão da produção de iNOS (LINARES, et al., 2000; SACKS, & SHER, 2002 e MATEO et al., 2003).

1.7 Os Efeitos da Hipóxia na Resposta Imune

Em condições normais, a pressão parcial de oxigênio (pO₂) no tecido cutâneo é de 50-60 mmHg. Durante infecções há mudanças na pressão parcial de oxigênio

tornando o micro ambiente tecidual hipóxico (oxigenação diminuída). O fluxo sanguíneo alterado, a isquemia e a proliferação de células e organismos infectantes são alguns dos fatores responsáveis pela hipóxia associada às infecções. Em tecido dérmico lesado, as medidas de pO_2 mostram gradientes hipóxicos de 5-28 mmHg. (HARRON et al., 2000). Na área central da lesão, onde se encontram grandes quantidades de fibrina, plasma e abundante população de leucócitos mediadores de inflamação, é normal encontrar os níveis mais baixos de pO_2 (LEWIS et al., 1999). A situação de hipóxia em lesões granulomatosas mediadas por macrófagos tem sido relacionada à indução de citocinas angiogênicas e à síntese de matriz extracelular por fibroblastos (HARRON et al., 2000).

Embora se saiba que ambientes com baixa pO_2 provocam apoptose em macrófagos (SHIMIZU, et al., 1996), estas células podem se adaptar gerando mudanças fenotípicas para garantir sua sobrevivência e funcionamento. Fato é que, macrófagos se acumulam no centro e nas adjacências de áreas hipóxicas e pouco vascularizadas dos tecidos lesados e são capazes de secretar substâncias nestas condições (LEWIS et al., 1999). Em caso de falta de oxigênio, os macrófagos fazem glicólise anaeróbica da hexose monofosfato, liberando ácido pirúvico, que na ausência do oxigênio rapidamente se converte em ácido láctico, deixando o ambiente nos vacúolos ainda mais ácido. Esta via metabólica anaeróbica permite que fagócitos possam eliminar microrganismos mesmo em condições de anaerobiose, como em granulomas. Nos locais de inflamação, normalmente, ocorrem processos isquêmicos devido às lesões teciduais que ocorrem nos vasos sanguíneos e, nestes ambientes, os macrófagos liberam citocinas, como o FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) que participam do processo de reconstrução vascular da região lesada (LEEPER-WOODFORD et al., 1999; LEWIS et al., 1999).

Macrófagos submetidos à hipóxia sintetizam maiores quantidade de citocinas, como as IL-1, IL-6 e TNF- α (SCANELL et al., 1993), e também da enzima iNOS (ALBINA et al., 1995), responsável pela síntese de NO, em associação aos ativadores como o INF- γ e o TNF- α , na presença de LPS (STUEHR, 1997). A produção de proteínas de choque térmico como a HSP-70 (70-Kd Heat Shock Protein) sofrem redução em períodos de hipóxia, e se as células foram reoxigenadas, a produção da HSP-70 retorna aos níveis pré-hipóxicos (DEGROSSOLI, et al., 2004). Em relação aos processos de fagocitose, estes também ficaram alterados em ambientes hipóxicos. Por exemplo, células de Kupffer submetidas à hipóxia *in vitro e in situ* mostraram diminuição da capacidade fagocítica para partículas de carbono em comparação com células de Kupffer que foram oxigenadas (LE KOPPELE et al., 1991).

Resumidamente, apesar de células como os monócitos e os macrófagos poderem sofrer apoptose em condições de hipóxia, elas também se adaptam a estes ambientes, alterando o seu metabolismo, produzindo linfocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1, e alterando as atividades exo-endofagocíticas. Vários mecanismos celulares de resposta à hipóxia têm sido propostos nos últimos anos como participantes do processo, mas não foram baseados em modelos experimentais de infecções (ALBINA et al., 1995; LEWIS et al., 1999; YUN et al., 1997). Nosso laboratório tem explorado o papel da hipóxia durante a infecção com *L. amazonensis*.

A lesão causada pelo parasito *L. amazonensis* tem características que levam à hipóxia tecidual, tais como, a presença de um grande número de amastigotas em divisão, a migração de células inflamatórias, as infecções secundárias com bactérias aeróbicas e anaeróbicas e a expressão de uma proteína presente em ambiente hipóxico, o fator de transcrição Hypoxia Inducible Fator (HIF1- α), (AUGUSTO et al., 1996; ALEXANDER et

al., 1999; SOLBACH et al., 2000; HANDMAN, 2000 e MATEO et al., 2003 e ARRAIS-SILVA et al., 2005), que justificam os estudos.

De fato, resultados recentes do nosso grupo de pesquisa obtidos, tanto com culturas primárias de macrófagos de camundongos como com linhagens tumorais, demonstraram que um ambiente de baixa tensão de oxigênio (5% O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂) tem efeito negativo no índice de infecção (COLHONE et al., 2004). Macrófagos submetidos à hipóxia fagocitam normalmente os parasitas, mas após a infecção apresentam-se “ativados” e controlam a proliferação de amastigotas. Os efeitos da hipóxia na infecção de macrófagos originados de monócitos de sangue humano com *L. amazonensis* ainda não tinham sido avaliados e são de extrema importância para a ampliação dos resultados e das conclusões obtidas com células de camundongos. Nosso modelo *in vitro* é mais próximo da situação da infecção que ocorre em seres humanos.

2-Objetivos

Os objetivos deste projeto inserem-se na principal linha de pesquisa do nosso laboratório de Leishmaniose e relacionam-se à compreensão do papel deletério e/ou terapêutico da hipóxia em infecções intracelulares como a leishmaniose. Especificamente, pretendemos:

- 1) Purificar monócitos humanos de sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis para obtenção de culturas de macrófagos humanos;
- 2) Padronizar o método de infecção de macrófagos humanos com *L. amazonensis*;
- 3) Avaliar o efeito da hipóxia na viabilidade de macrófagos humanos e no índice de infecção dessas células com *L. amazonensis*;
- 4) Avaliar a produção de TNF- α nas culturas de macrófagos humanos submetidos à hipóxia.

3- Materiais e Métodos

Lista de Compostos e Equipamentos Usados e Procedências

Meio RPMI	Sigma Aldrich Co (USA)
Soro Fetal Bovino Inativado	Sigma Aldrich Co (USA)
Lipopolissacarídeos de <i>E. coli</i> (LPS)	Sigma Aldrich Co (USA)
Gentamicina/penicilina	Sigma Aldrich Co (USA)
TNF- α recombinante	Amersham Life science (USA)
Cell Growth Determination Kit, MTT Based	Sigma Aldrich Co. (USA)
Bicarbonato de Sódio	Sigma Aldrich Co (USA)
HEPES	Sigma Aldrich Co (USA)
Histopaque 1.077	Sigma Aldrich Co (USA)
Placa de Cultura de 24/96 Poços	Corning TRP Co. (USA)
Tubos Cônico p/ Centrífuga 15/50 ml	Corning TRP Co. (USA)
Centrífuga Eppendorf 5810	Eppendorf (USA)
Estufa de CO ₂ Shelab TC 2323	Shellab (USA)
Fluxo Laminar Veco Clean plus 09	Veco (Brasil)

3.1 Animais

Camundongos isogênicos fêmeas da linhagem BALB/c, livres de patógenos específicos, com idade entre 6 e 12 semanas, foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB/UNICAMP e foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

3.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado no cultivo de parasitos e de monócitos/macrófagos humanos foi o RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB (inativado a 56°C durante 1 hora) para os parasitos e 20% de SFB para os macrófagos humanos, 20 mM de bicarbonato de sódio, 10mM de tampão HEPES e 25µg/ml de gentamicina ou penicilina/estreptomicina.

3.3 Obtenção e Manutenção do Parasito

O parasito utilizado foi a *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). As formas amastigotas foram mantidas em camundongos BALB/c através da inoculação subcutânea de 2×10^6 parasitos no coxim plantar de uma das patas traseiras. Os amastigotas foram retirados de lesões desenvolvidas nas patas desses animais por meio de raspagens com bisturi em salina estéril suplementada com gentamicina (2µg/ml). A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril para retirada de resíduos (protocolo adaptado de Cantos et al., 1993). O número de amastigotas foi contado em câmara de Neubauer.

Para diferenciação em promastigotas, frascos de cultura com amastigotas em meio RPMI 1640 foram mantidos em estufa seca, com temperatura de 26 a 28°C. Após 2 a 3 dias, ocorria a diferenciação. As formas promastigotas foram mantidas em frascos plásticos

de cultura, com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB estéril em estufa seca a temperatura de 26 a 28°C.

3.4 Condições de Microambiente Hipóxico

O ambiente hipóxico foi estabelecido com a lavagem de uma câmara incubadora (Billups – Rothenberg, modelo MIC 101) com a mistura gasosa padrão primário (White Martins) a 2 % de oxigênio, 5 % de CO₂ e balanceada com nitrogênio, pelo período de 15 minutos. Em seguida, as mangueiras de entrada e saída de gás foram fechadas e a câmara mantida em estufa a 37°C.

Para aferir o grau de hipóxia dentro da câmara foi utilizado um analisador de gás (testoryt/confort), com uma solução absorvente do oxigênio (Oxsorbent-EUA). Após a lavagem da câmara, a entrada de gás foi fechada e a saída acoplada a extremidade do analisador. Por meio de compressão de uma pêra acionada por 18 vezes consecutivas, o ar de dentro da câmara entrou em contato com a solução absorvente dentro do analisador e depois de homogeneizada a solução, mediu-se a concentração de oxigênio que, em nossos experimentos foi de 6%. A tensão de oxigênio no meio foi de 37 mmHg sob condições hipóxicas e de 150 mmHg sob condições normóxicas (estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C).

3.5 Obtenção e Cultivo de Macrófagos Primários Humanos a partir de Monócitos de Sangue Periférico:

3.5.1 Procedimentos de Coleta de Sangue Periférico:

A coleta de sangue foi feita em doadores adultos e saudáveis doadores de sangue, com agulha estéril em tubo estéril de vácuo (volume de 9ml), revestidos internamente com heparina ou EDTA (Vacoutainer, Brasil).

3.5.2 Separação dos Monócitos de Sangue Periférico com Histopaque® 1.077:

Imediatamente após a coleta de sangue, em fluxo laminar procedeu-se o seguinte protocolo: em tubo cônico foi colocada mistura 3:5 de sangue/PBS (salina em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4) isento de cálcio e magnésio. Cuidadosamente, em tubo cônico p/ centrífuga, colocamos a mistura sangue/PBS sobre Histopaque® 1.077 (Sigma), na proporção de 8:3 (sangue/Histopaque). O material foi centrifugado a 400G (1.500 RPM) durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a camada intermediária opaca, continha células mononucleares. As células foram lavadas a 250G (1250 RPM) por 10 minutos, à temperatura ambiente, duas vezes (protocolo adaptado de Product information Sigma - Histopaque® 1.077; FELDMAN et al., 1987; KELLEY et al., 1988; KALMAR et al., 1988).

As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB, e o total de células viáveis contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de “Tripan Blue” diluída 10:1 em meio de cultura. Foi realizada contagem diferencial para avaliar a morfologia das células e para estabelecer o número aproximado de monócitos na amostra, corando-se com cristal violeta 1mg/ml em ácido acético 10% (200 µl dos monócitos + 50 µl do corante).

O cálculo do número de monócitos é feito usando-se a seguinte fórmula e considerando-se 20% das células como monócitos:

$$\text{No. de monócitos/ml} = \text{no. de células totais} \times 10^4 \text{ por ml} \times 20\%.$$

3.5.3 Cultivo de Macrófagos Primários Humanos:

Cerca de $0,5 \times 10^6$ células foram cultivadas em lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro inseridas em placa de cultura de 24 poços com 1ml de meio RPMI 1640 durante 7 dias à 37°C, sob 21% de O₂, 5% de tensão de CO₂ (adaptado de BERMAN et al., 1979). A

cada dois dias era realizada a aspiração do meio de cultura e a colocação de meio fresco (adaptado de DORTA, 1997).

3.6 Testes de Infecção e Fagocitose de Macrófagos Primários Humanos com *L. amazonensis*

3.6.1 Infecção com *L. amazonensis*

As células, obtidas após 7 dias de cultura, foram incubadas durante 24 horas com amastigotas ou promastigotas de *L. amazonensis* em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C. (BERMAN et al., 1979). Após 24 horas, as lamínulas de vidro contendo macrófagos foram retiradas da estufa e das placas de cultura. As lamínulas foram lavadas em solução salina, secas, e fixadas em metanol durante 15 minutos, transferidas para solução de Giemsa durante 10 minutos e lavadas em água destilada. Após a secagem, foram montadas com resina em lâminas de vidro. A avaliação das porcentagens de macrófagos humanos infectados e as proporções de parasito/macrófago contando-se de 200 células por lamínula, foi realizada em microscopia ótica com aumento de 1000 vezes. As fotos foram obtidas em câmara digital de captura de imagens, Lool.SMA Procolor, programa Image Pró-plus (Media Cybernetcs, USA) conectada a um microscópio Nikon Elipse E-800 (Japão).

3.6.2 Cultivo de Macrófagos Primários Humanos com “Beads”

Macrófagos humanos, obtidos após 7 dias de cultura, foram incubadas durante 24 horas em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C, com microesferas de poliestireno de 6 micrômetros, “beads” (Poly Science, USA). A coloração das lamínulas, a avaliação das porcentagens de macrófagos que fagocitaram “beads”, e as proporções de “beads” por célula foram realizadas conforme descrito no item 3.6.1.

3.6.3 Infecção de Macrófagos em Ambiente Hipóxico

Protocolo 1: Células incubadas em hipóxia com amastigotas de *L. amazonensis* por 24 horas no 7º. dia de cultura. Após 7 dias de cultura em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C, macrófagos humanos foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2:1 (parasito:célula) e imediatamente colocados em câmara incubadora com 5% O₂ , 5% CO₂, balanceado com N₂, a 37°C durante 24 horas (vide esquema 1).

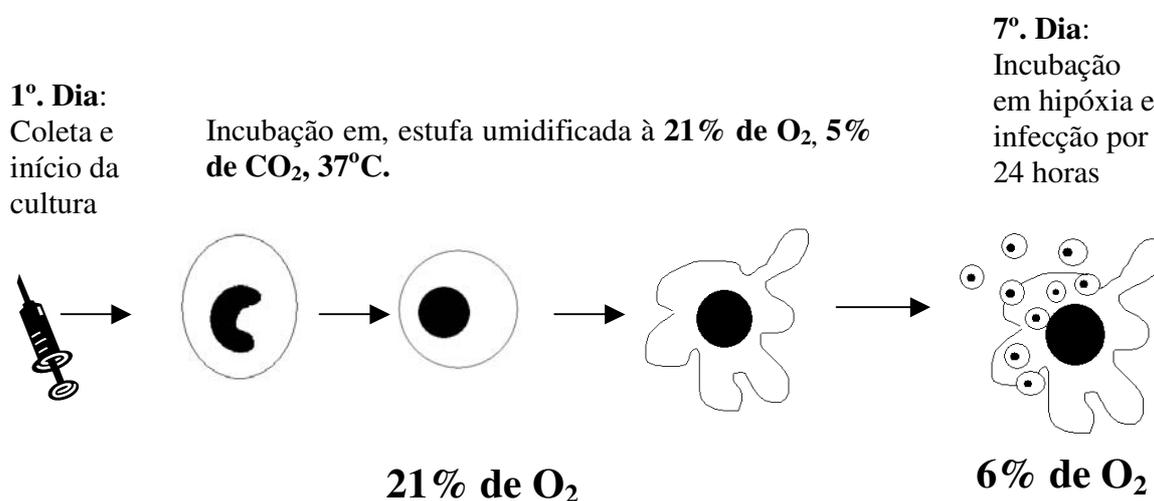
Protocolo 2: Células incubadas em hipóxia por 24 horas no 6º. dia de cultura seguido de incubação com amastigotas de *L. amazonensis* por 24 horas no 7º. dia de cultura. Após 6 dias de cultura em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C, macrófagos humanos foram colocados em câmara incubadora com 5% O₂ , 5% CO₂, balanceado com N₂, a 37°C durante 24 horas. Após este período (7º. dia de cultura) foram retirados e infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2:1 (parasito:célula) e incubados em ambiente normóxico (estufa de 5% CO₂ à 37°C e 21% de O₂) por mais 24 horas. Este protocolo também foi feito, usando-se microesferas de poliestireno de 6 micrômetros, (“beads”), no lugar dos parasitos (vide esquema 2).

Protocolo 3: Células incubadas em hipóxia por 24 horas no 7º. dia de cultura seguido de incubação com amastigotas de *L. amazonensis* por 24 horas no 8º. dia de cultura. Após 7 dias de cultura em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C, macrófagos humanos foram colocados em câmara incubadora com 5% O₂ , 5% CO₂, balanceado com N₂, a 37°C durante 24 horas. Após este período (8º. dia de cultura) foram retirados da hipóxia e infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2:1 (parasito:célula) e incubados em ambiente normóxico (estufa de 5% CO₂ à 37°C e 21% de O₂) por mais 24 horas (vide esquema 3).

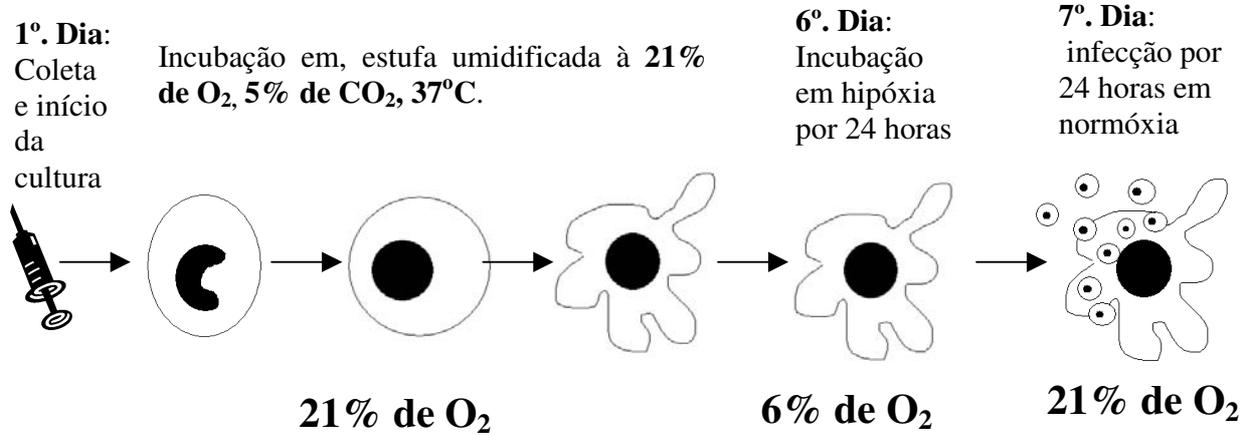
Protocolo 4: Células incubadas em hipóxia por 24 horas no 8º. dia de cultura seguido de incubação com amastigotas de *L. amazonensis* por 24 horas no 9º. dia de cultura. Após 8 dias de cultura em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C, macrófagos humanos foram colocados em câmara incubadora com 5% O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂, a 37°C durante 24 horas. Após este período (9º. dia de cultura) foram retirados e infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2:1 (parasito:célula) e incubados em ambiente normóxico (estufa de 5% CO₂ à 37°C e 21% de O₂) por mais 24 horas (vide esquema 4).

Em todos os protocolos a coloração das lamínulas, a avaliação das porcentagens de fagocitose dos macrófagos e as proporções de beads por célula foram realizadas conforme descrito no item 3.6.1.

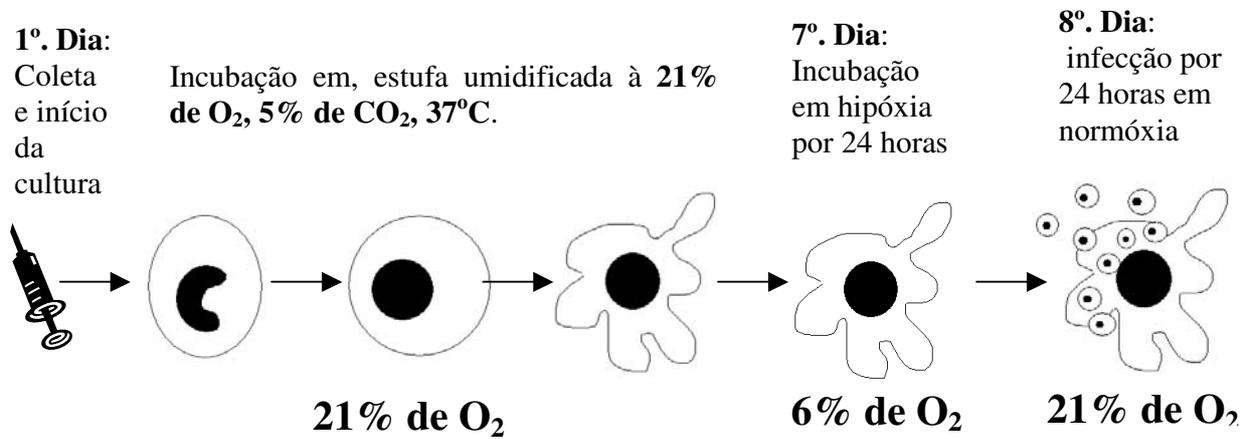
ESQUEMA 1



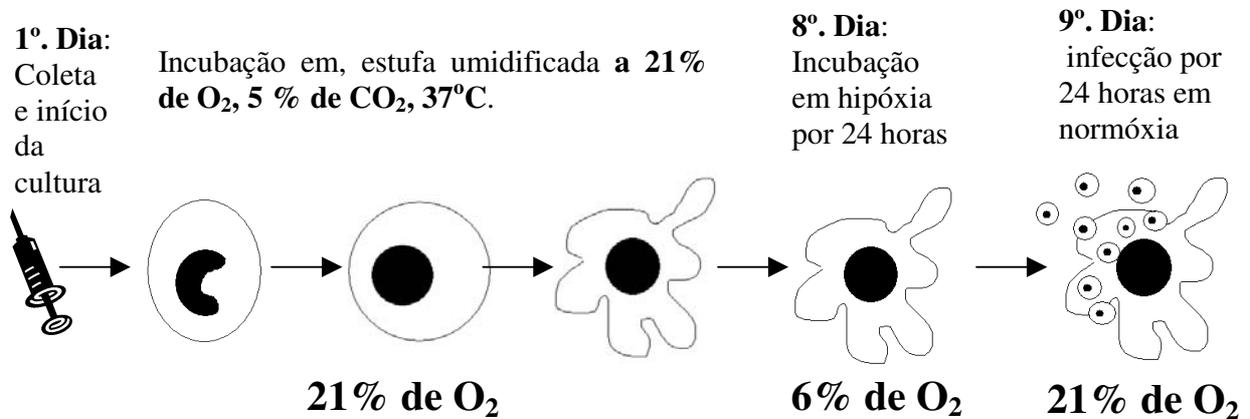
ESQUEMA 2



ESQUEMA 3



ESQUEMA 4



3.6.4 Avaliação do Efeito do Meio de Cultura

Após 6 dias de cultura em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C, macrófagos humanos foram colocados em câmara incubadora com 5% O₂ , 5% CO₂, balanceado com N₂, a 37°C durante 24 horas. Após este período (7º. dia de cultura), as culturas tiveram o seu meio trocado por meio novo e infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2:1 (parasito:célula), e incubados em ambiente normóxico (estufa de 5% CO₂ à 37°C e 21% de O₂) por mais 24 horas.

3.7 Teste de Viabilidade Celular

A viabilidade dos macrófagos foi determinada através do teste do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MOSMANN, 1983), conforme o seguinte protocolo: 200 µl de meio RPMI com 20 % de SFB contendo 3x10⁴ monócitos coletados do sangue periférico (item 3.5.1 e 3.5.2) foram inseridos em poços de placas de cultura de 96 poços e cultivados durante 6 dias em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C. Após 6 dias de cultura, as células foram colocadas em câmara incubadora com 5% O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂, a 37°C, durante 24 horas.

Após 7 dias de cultura, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100µl de meio novo + 10 µl de MTT. As células foram, então, incubadas durante 4 horas em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C. O controle negativo (células mortas) foi obtido adicionando 52 mM de peróxido de hidrogênio às culturas e o controle positivo foi obtido de células cultivadas 7 dias em ambiente normóxico (estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C). Após este período, o meio + MTT foi retirado e acrescentado 100 µl de solução de MTT mantendo a placa de cultura durante uma hora sob agitação constante (Maxi Rocker, Lab-Line). As placas foram retiradas e foi feita a leitura em 590 e 650 nm, usando meio de cultura puro como parâmetro para o branco. Os resultados foram obtidos usando-se a fórmula: Média da Σ da absorbância de (590nm – 650nm)

3.8 Determinação da Produção do TNF- α

3.8.1 Obtenção de Sobrenadantes de Culturas de Macrófagos

Monócitos coletados do sangue periférico (item 3.5.1 e 3.5.2) foram cultivados em poços de placas de cultura durante 6 dias em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C. Após este período, adicionou-se LPS (1µg/ml) ou amastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2:1 (parasito:célula). As células foram incubadas em ambiente hipóxico (câmara incubadora com 5% O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂, a 37°C) ou normóxico (estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C). Após 24 horas, os sobrenadantes das culturas foram aspirados, centrifugados à 1.500 RPM por 10 minutos e congelado a -70°C para posterior dosagem e detecção de TNF- α .

3.8.2 Teste de Detecção de TNF- α

Células de fibroblastos tumorais murinos L929 sensíveis a TNF- α (LEEPER & WOODFORD, 1999) foram usadas nos testes de detecção de TNF- α dos sobrenadantes obtidos de macrófagos humanos.

Cerca de 3×10^4 células tratadas com actinomicina D, 2 μ g/ml, foram transferidas para placa de 96 poços e incubadas em estufa umidificada a 21% de O₂, 5 % de CO₂, 37°C, durante 18 horas (MOLL et al., 2000).

As placas de cultura de L929 tiveram o meio de cultura substituído por sobrenadantes a serem testados. O controle negativo para citotoxicidade foi obtido incubando células L929 em normóxia apenas com meio RPMI 1640, com actinomicina D. O controle positivo para citotoxicidade foi obtido incubando as células L929 com meio RPMI 1640 e TNF- α recombinante em uma concentração letal (0,9 ng/ml).

As células foram coradas com solução de cristal violeta, 0,5% em metanol 20% por 10 minutos, lavadas com água destilada. A determinação da quantidade de células L929 sensíveis ao TNF- α foi feita em leitor de ELISA, 540nm (FLICK & GIFFORD, 1984 e MEAGER, et al., 1989).

A porcentagem de toxicidade foi calculada usando o seguinte cálculo (FLICK & GIFFORD, 1984):

$$\% \text{ citotoxicidade} = \frac{\text{Média da Absorbância controle negativo} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Média Absorbância controle negativo}}$$

A porcentagem média da citotoxicidade de cada amostra foi obtida pela média simples de seis testes para cada amostra.

Os resultados são comparados com uma curva-padrão de citotoxicidade obtida utilizando quantidades conhecidas de TNF- α recombinante recentemente feita em nosso laboratório.

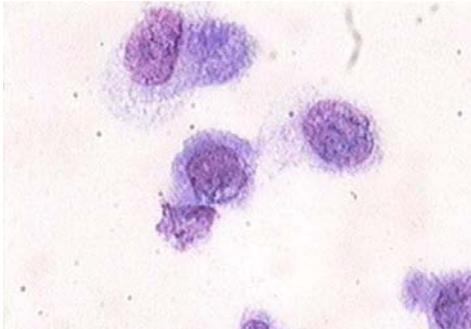
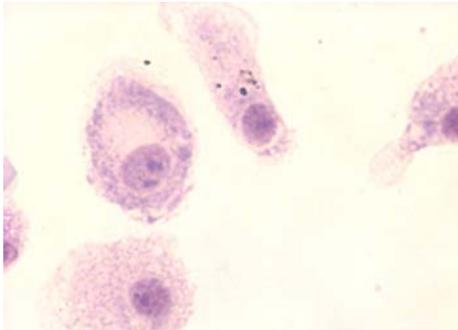
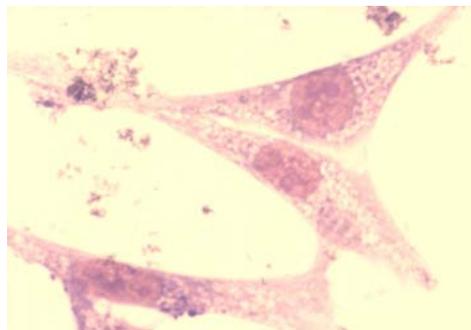
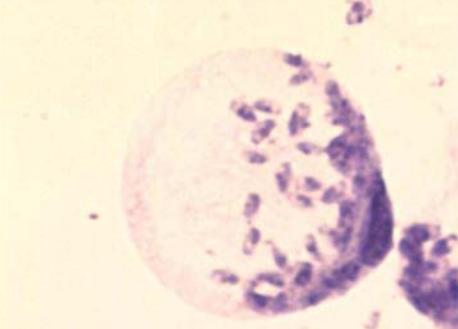
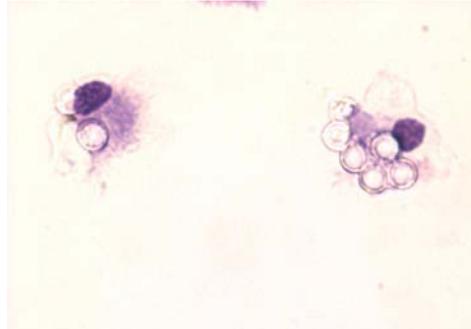
3.9 Análise Estatística

O teste estatístico utilizado foi o Teste-T independente, do software BioEstat 3.0 (2003).

4-Resultados

4.1 Obtenção de Macrófagos Humanos:

Com o objetivo de comprovar a eficiência dos nossos protocolos de purificação de monócitos de sangue periférico e de cultivo de macrófagos, primeiramente analisamos a morfologia dos monócitos. As análises morfológicas iniciais feitas após a extração do sangue confirmaram a presença de monócitos, células comparativamente menores que os macrófagos, com pouco citoplasma e núcleo reniforme bastante característico (fig.1A). Após 4 dias de cultivo em meio RPMI 1640, observamos a mudança morfológica das células, que passaram a apresentar características mais comuns aos macrófagos, isto é, aumento do citoplasma e núcleo arredondado (fig.1B). Estas células, após 7 e 8 dias de cultura, apresentavam-se morfológicamente como macrófagos, isto é, com um grande núcleo arredondado, quantidade abundante de citoplasma e prolongamentos da membrana plasmática (figs. 1C e 1D, respectivamente). A viabilidade analisada por “Tripan Blue” foi de aproximadamente 95,5%. A confirmação de que estas células eram macrófagos veio também da análise funcional, isto é, comprovamos sua capacidade fagocítica. Utilizando formas amastigotas de *L. amazonensis* e “beads” de poliestireno (figs.1E e 1F), observamos os parasitos e os beads dentro de vacúolos fagocitários. Análises por citometria de fluxo de células obtidas e cultivadas utilizando o nosso protocolo e realizados por Bosetto & Giorgio confirmaram o fenótipo característico de macrófagos (CD14⁺, HLA-DR⁺, CD4⁻, e CD3⁻, BOSETTO & GIORGIO, dados não publicados).

	
<p>Figura 1A: Lâmina de esfregaço de sangue humano contendo monócito recém extraído, corada com Giemsa. Notar o grande núcleo riniforme característico (aumento de 1000 X).</p>	<p>Figura 1B: Monócitos humanos após 4 dias de cultura, corados com Giemsa. Notar o aumento da quantidade de citoplasma e o núcleo arredondado (aumento de 1000 X).</p>
	
<p>Figura 1C Macrófagos humanos após 7 dias de cultura, corados com Giemsa. Notar os prolongamentos aumento do volume citoplasmático (aumento 1000 X).</p>	<p>Figura 1D: Macrófagos humanos após 7 dias de cultura, corados com Giemsa. Notar os prolongamentos bastante pronunciados (aumento de 1000 X).</p>
	
<p>Figura 1E: Macrófagos humanos após 7 dias de cultura, corados com Giemsa e infectados <i>L. amazonensis</i>. Notar o vacúolo parasitófago repleto de amastigotas (aumento de 1000 X).</p>	<p>Figura 1F: Macrófagos humanos após 7 dias de cultura, corados com Giemsa e incubados com beads plásticos. Notar os “beads” envolvidos pela membrana plasmática (aumento de 1000 X).</p>

4.2 Infecção de Macrófagos Humanos com *L. amazonensis*

Comprovada a viabilidade e a funcionalidade das culturas de macrófagos humanos, nosso próximo passo foi avaliar qual das formas infectantes de *L. amazonensis* (promastigotas ou amastigotas) apresentaria índices mais satisfatórios de infecção. Foram realizados experimentos comparando-se a porcentagem de infecção de macrófagos cultivados com as formas amastigotas e promastigotas. Conforme demonstrado na figura 2, observamos que os amastigotas, em proporções de, 1 ou 2 parasitos por macrófago, infectavam mais de 50% das células após 24 horas de cultura. Os promastigotas, mesmo quando introduzidos em grandes quantidades nas culturas de macrófagos (10 promastigotas por macrófago), infectaram menos de 20% das células. Como este índice foi inferior inclusive ao observado nos experimentos com beads (cerca de 35 % das células fagocitaram os beads), optamos por trabalhar com as formas amastigotas.

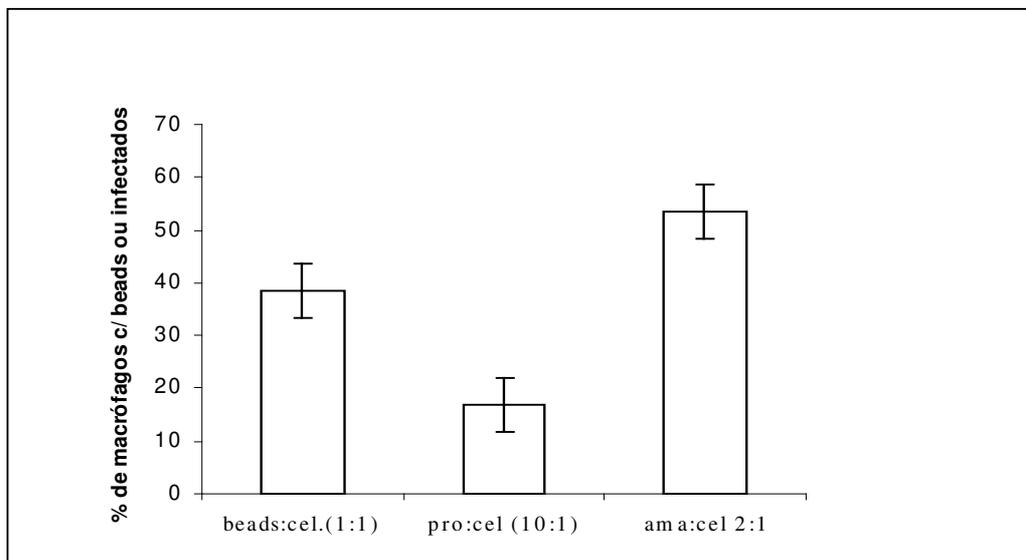


Figura 2: Capacidade fagocítica de macrófagos humanos. Macrófagos humanos após 7 dias de cultura infectados durante um período de 24 horas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção 10:1 (promastigotas : macrófago), amastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2:1(amastigotas : macrófago) e incubados com” beads” na proporção 1:1 (bead : macrófago).

A figura 3 mostra resultados de um experimento representativo realizado para avaliar o nível de infecção de macrófagos humanos incubados com diferentes proporções de amastigotas de *L. amazonensis* por macrófagos. Observamos que incubações nas razões de 50 ou 20 amastigotas por célula resultaram em infecções de macrófagos com excesso de amastigotas e parasitos aderidos às células, não sendo possível uma visualização precisa dos parasitos. As proporções de 10 e 4 amastigotas por macrófago resultaram em excesso de formas amastigotas dentro de macrófagos, e em lise celular acentuada (proporção de 10 amastigotas por macrófago, fig. 3A). As razões de 2, 1, 0,5 ou 0,25 amastigotas por macrófago resultaram em boa visualização dos parasitos intracelulares e facilidade na contagem de células e parasitos. Não havendo diferença significativa entre as razões de 1 e 2 ama/macrófago, optamos por utilizar a proporção de 2 amastigotas por macrófago, pois, nesta proporção encontramos as culturas mais homogêneas em relação à infecção (Fig. 3A). A quantidade de amastigotas fagocitados nesta proporção também facilitou a contagem de amastigotas intracelulares (Fig. 3B).

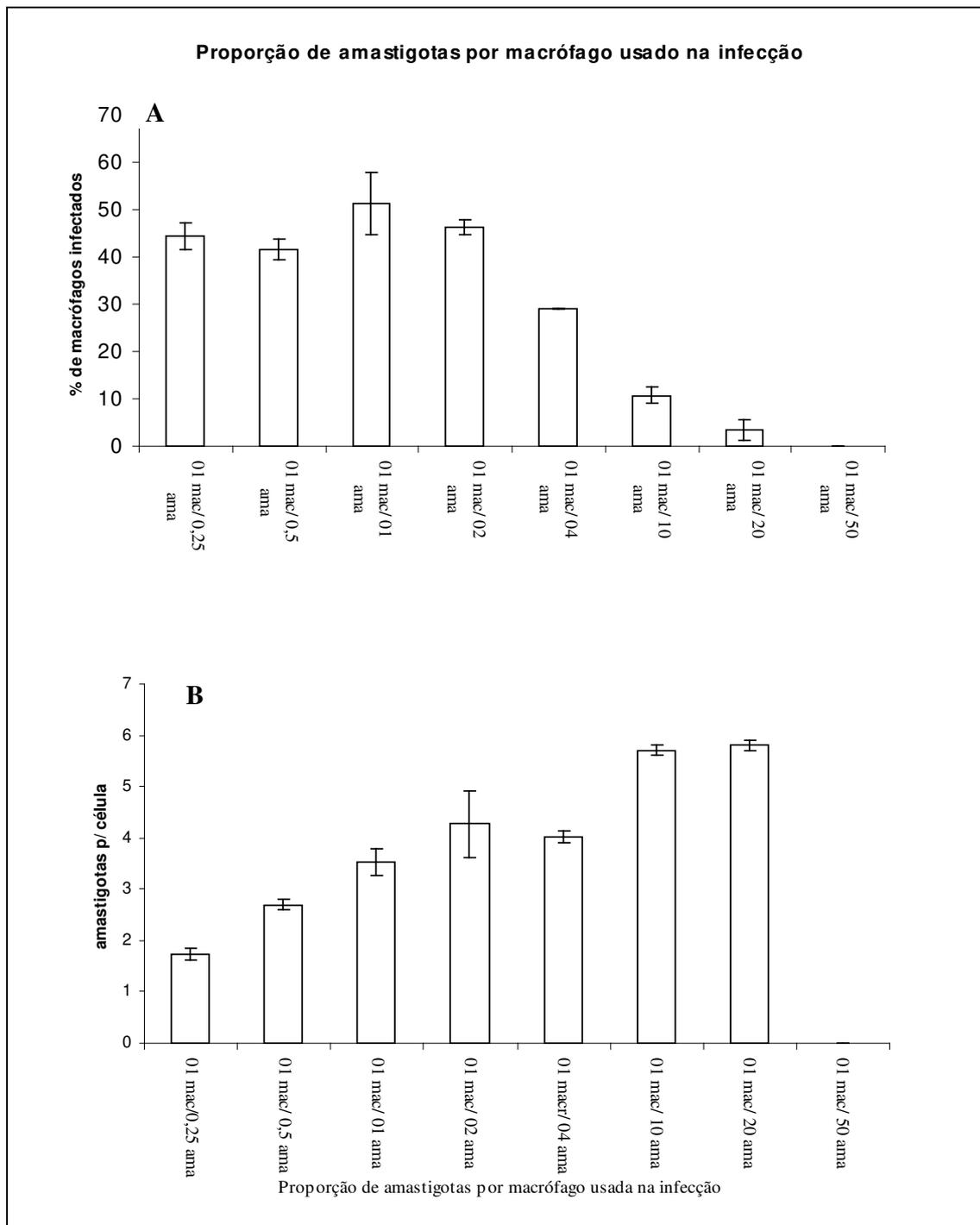


Figura 3: Infecção de macrófagos humanos com amastigotas de *L. amazonensis*. MHP após 7 dias de cultura foram incubados por um período de 24 horas com amastigotas de *L. amazonensis* em várias proporções de parasitas por células. As lamínulas foram coradas com Giemsa e a porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas fagocitados pelos macrófagos (B) avaliados em microscópio óptico (mac = macrófago e ama = amastigota). Não houve diferença significativa entre as proporções de 1/1 e 2/1 e 4/1 ama/célula.

Na figura 4 observamos os índices de infecção de culturas de macrófagos humanos incubados com amastigotas durante vários períodos de tempo. Observamos que no período de 24 horas de incubação a porcentagem de infecção é cerca de 25% e 35% maior do que nos períodos de 48 e 72 horas, respectivamente. No período de 96 horas de incubação observou-se grande quantidade de lise celular. Optamos por trabalhar com o período de 24 horas.

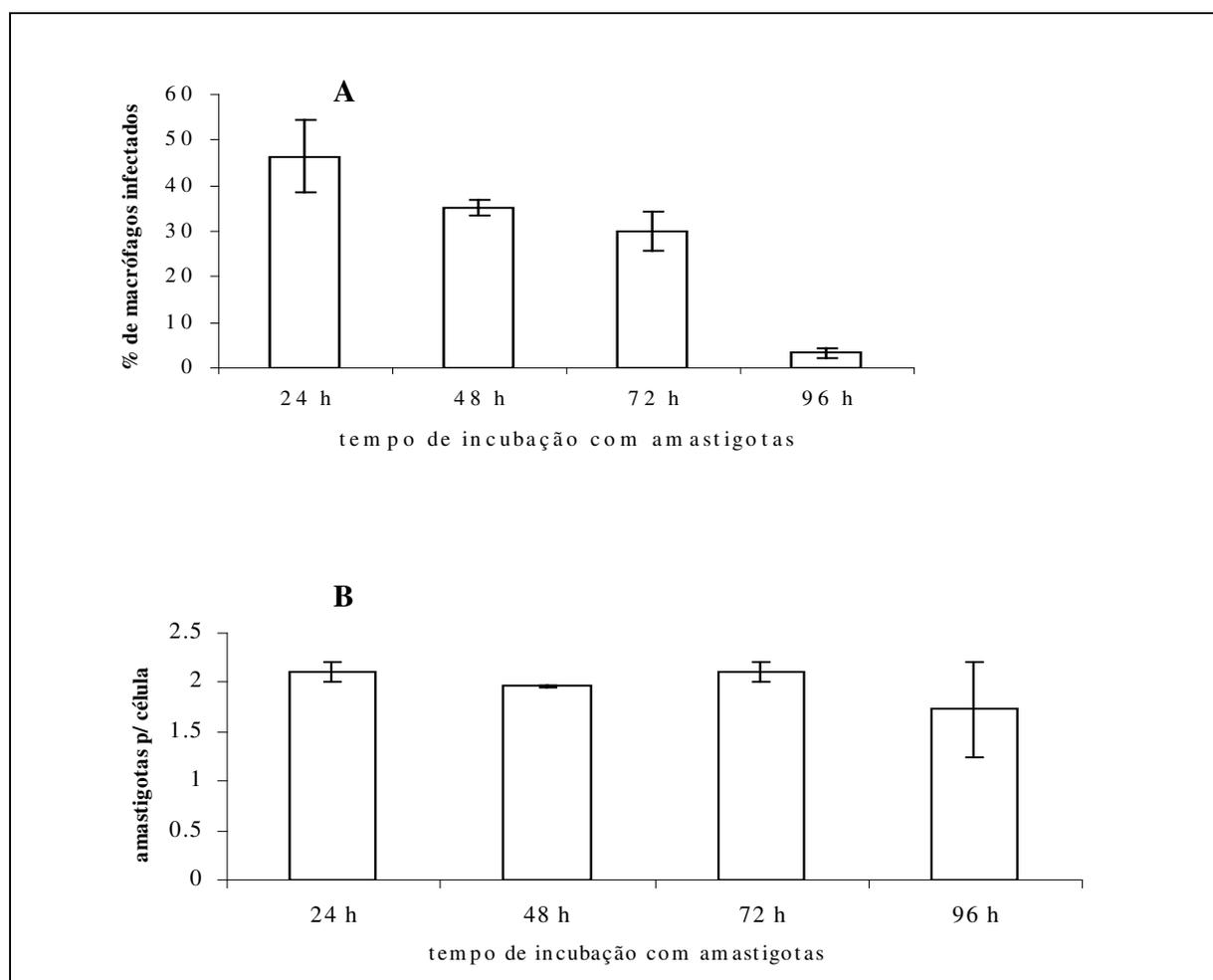


Figura 4: Infecção de macrófagos humanos com amastigotas de *L. amazonensis* durante vários períodos de tempo em normóxia: MHP após 7 dias de cultura foram infectados por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (2 amastigotas de *L. amazonensis* por célula). As lamínulas foram coradas com Giemsa e a porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas dentro de macrófagos (B) foram avaliados por microscopia ótica.

4.3 Infecção de Macrófagos Humanos em Hipóxia

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito de diferentes protocolos de hipóxia na infecção de *L. amazonensis* em macrófagos humanos. Foram iniciados os testes submetendo-se as culturas de macrófagos humanos à microambiente com 6% de oxigênio, 5% de CO₂, balanceados com nitrogênio, (hipóxia) ou com 21% de oxigênio, 5% de CO₂, balanceados com nitrogênio (normóxia).

No primeiro protocolo, em que os resultados estão mostrados na figura 5, as células foram cultivadas durante 7 dias em normóxia e levadas para câmara hipóxica no 7º. dia, quando foram infectadas com *L. amazonensis* e mantidas neste ambiente por 24, 48, 72 e 96 horas. Na figura 5 observa-se que não houve diferenças significativas nas porcentagens de infecção entre as culturas de macrófagos humanos submetidas à ambiente hipóxico e normóxico. Após 24, 48 ou 72 horas de incubação as culturas tinham 46,5%, 35%, 30% e 3% de macrófagos infectados, respectivamente, em normóxia e 42%, 34,5%, 35% e 9% de infecção respectivamente em hipóxia. O número de amastigotas por célula não variou em culturas mantidas em normóxia e hipóxia. Após 96 horas de incubação com os parasitos, os macrófagos apresentaram grande índice de lise celular tanto em hipóxia quanto em normóxia.

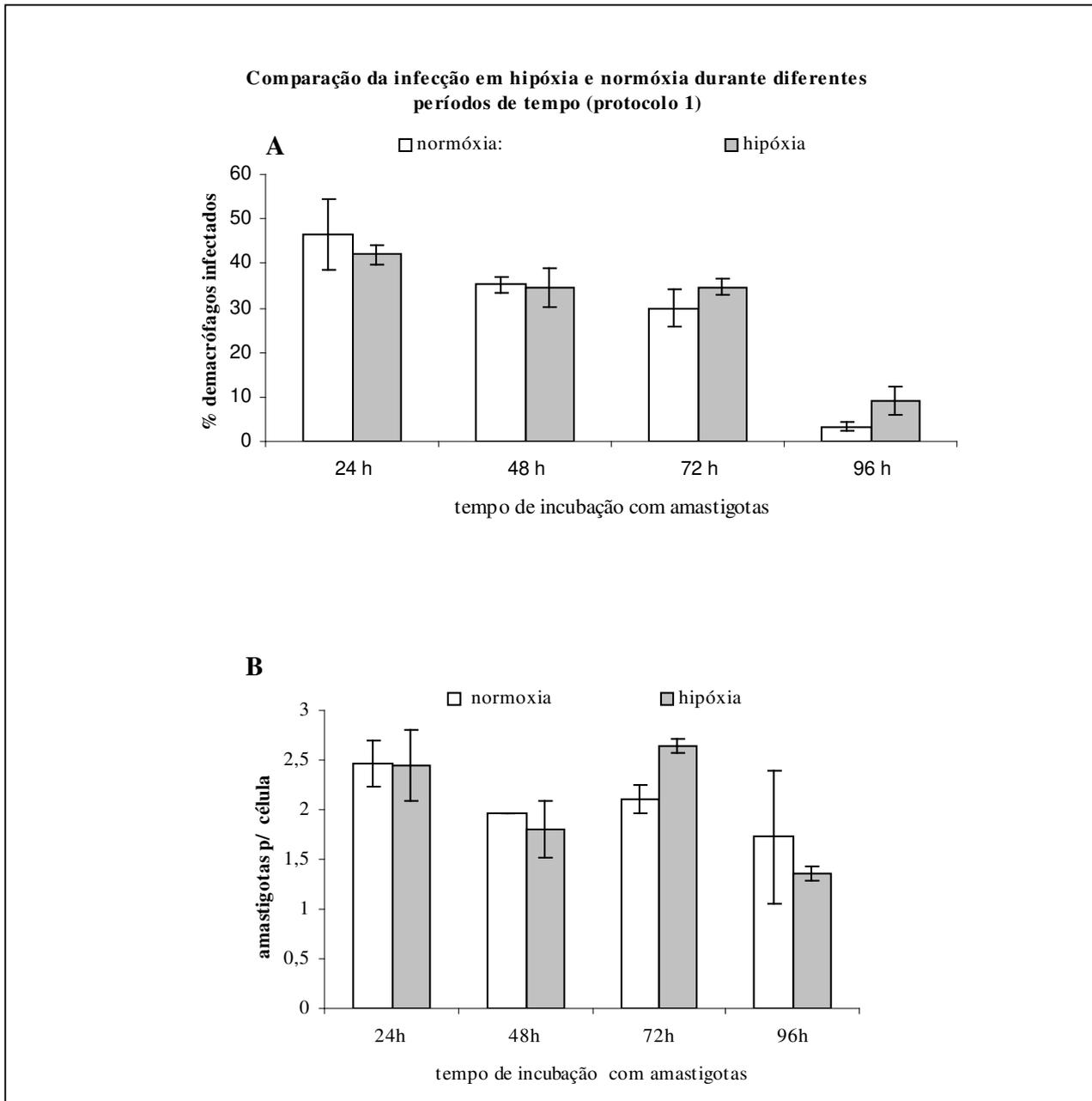


Figura 5: Infecção de macrófagos humanos por amastigotas de *L. amazonensis* por vários períodos de tempo em condições de hipóxia e normóxia Macrófagos humanos após 7 dias de cultura em normóxia foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (2 amastigotas para 1 macrófago), e mantidos em ambientes normóxico ou hipóxico durante 24, 48, 72 e 96 horas. As lamínulas foram coradas e a porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas dentro de macrófagos (B) foi avaliado por microscopia óptica.

Não tendo obtido resultados diferentes em ambientes hipóxico e normóxico com o protocolo anterior (fig. 5), nosso objetivo, a seguir, foi verificar se macrófagos humanos podiam apresentar comportamentos diferentes em relação à infecção se fosse modificado o protocolo de hipóxia. No segundo protocolo testado, macrófagos com 6 dias de cultura foram incubados por 24 horas em microambiente hipóxico. Após este período de hipóxia (24 horas no 7º dia de cultura), as células foram retiradas da câmara hipóxica, infectadas em ambiente normóxico com formas amastigotas de *L. amazonensis* e incubadas por mais 24 horas em ambiente normóxico (8º dia de cultura). A porcentagem de macrófagos infectados após este período em hipóxia foi comparada com a porcentagem de macrófagos que permaneceram em normóxia durante 7 dias consecutivos e infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que em culturas submetidas à hipóxia antes da infecção com *L. amazonensis* havia 72 % menos macrófagos infectados do que em culturas mantidas em normóxia (cerca de 47% de células infectadas quando ficaram em normóxia e 14% de células infectadas quando passaram por hipóxia, fig. 6). O número de amastigotas intracelulares tanto em hipóxia quanto em normóxia foram estatisticamente semelhantes. A diminuição do nível de fagocitose e de infecção em macrófagos humanos expostos à hipóxia é um dado semelhante aos obtidos em nosso laboratório com macrófagos peritoniais murinos e também em estudos anteriores (LE KOPPELE, et al., 1999 e COLHONE, et al., 2004).

Nosso próximo passo (protocolo 3) foi avaliar se macrófagos humanos submetidos à pré-exposição hipóxia após 7 dias de incubação também teriam comportamento diferente daquele de células infectadas em normóxia. No terceiro protocolo, macrófagos humanos com 7 dias de cultura, foram incubados por 24 horas em hipóxia, retirados e infectados em ambiente normóxico com formas amastigotas de *L. amazonensis* e cultivados por mais 24

horas em normóxia. A percentagem de macrófagos infectados destas culturas foi comparada com a percentagem de macrófagos de culturas que permaneceram em normóxia durante 8 dias consecutivos e infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que estas culturas também apresentaram menores percentagens de macrófagos infectados do que as culturas que ficaram em normóxia (cerca de 67% de células infectadas quando ficaram em normóxia e 26% de células infectadas quando passaram por hipóxia, fig. 7). As quantidades de amastigotas intracelulares em hipóxia e normóxia foram diferentes estatisticamente.

A seguir, os macrófagos foram cultivados durante 8 dias de cultura em normóxia (protocolo 4) e foram retirados deste ambiente, incubados por 24 horas em hipóxia, infectadas com *L. amazonensis* no 9º. dia de cultura e comparadas a macrófagos que foram incubados 8 dias em normóxia e infectados com *L. amazonensis* em normóxia no 9º. dia de cultura. Observamos resultados semelhantes aos protocolos anteriores (protocolos 2 e 3), isto é, redução da infecção (61% de células infectadas quando ficaram em normóxia e 34% de células infectadas quando passaram por hipóxia, fig.8). As quantidades de amastigotas intracelulares foram estatisticamente semelhantes tanto em hipóxia quanto em normóxia.

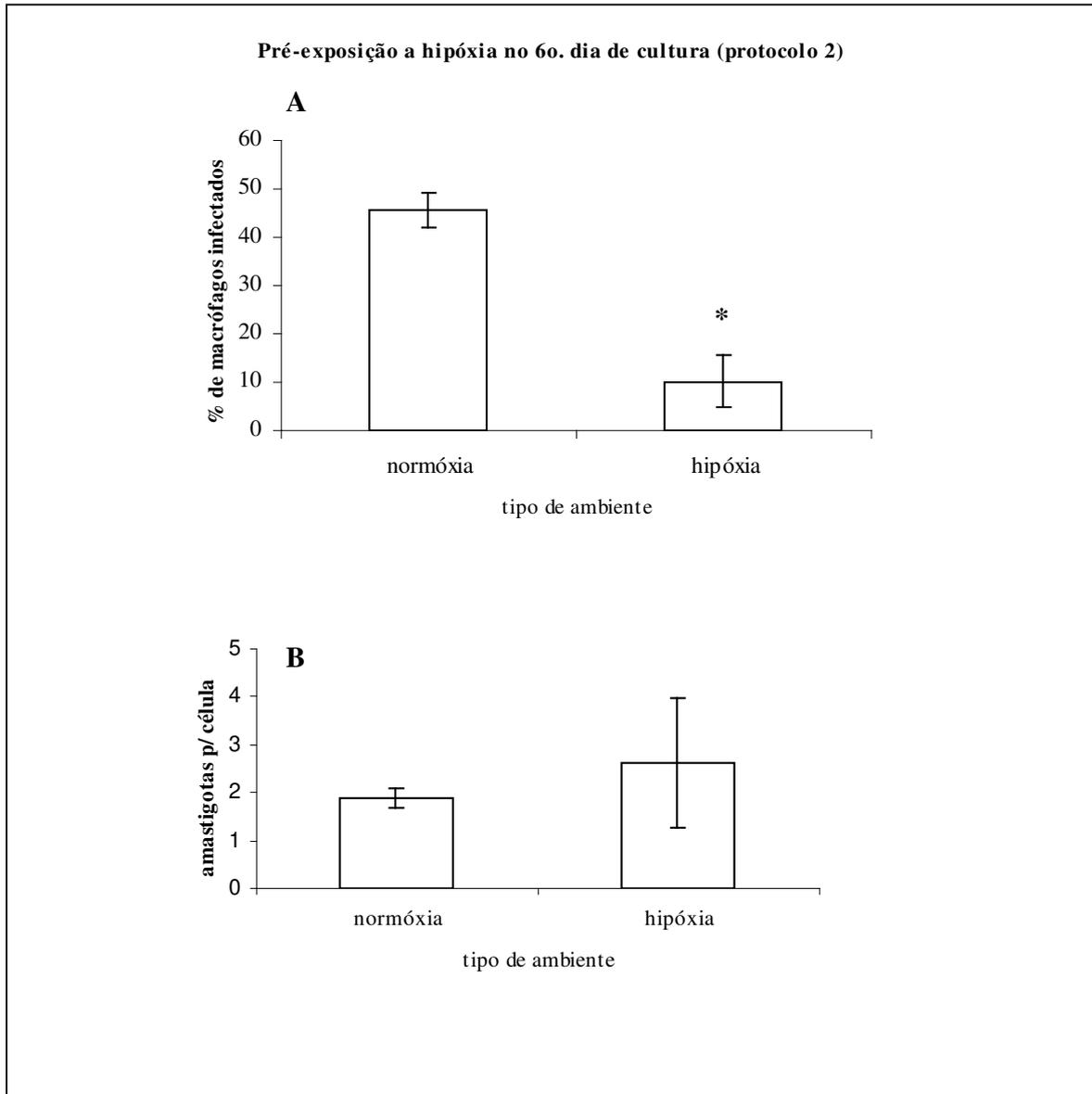


Figura 6: Infecção de macrófagos humanos com amastigotas de *L. amazonensis* em condições de pré-exposição à hipóxia e em normóxia. : Macrófagos Humanos após passarem por período de 24 horas de hipóxia no 6º. dia de cultura foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* no 7º. dia de cultura, na proporção de 2 amastigotas para 1 macrófago. A porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas dentro de macrófagos (B) foram avaliados por microscopia ótica. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas (* $P < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre o número de amastigotas dentro de macrófagos.

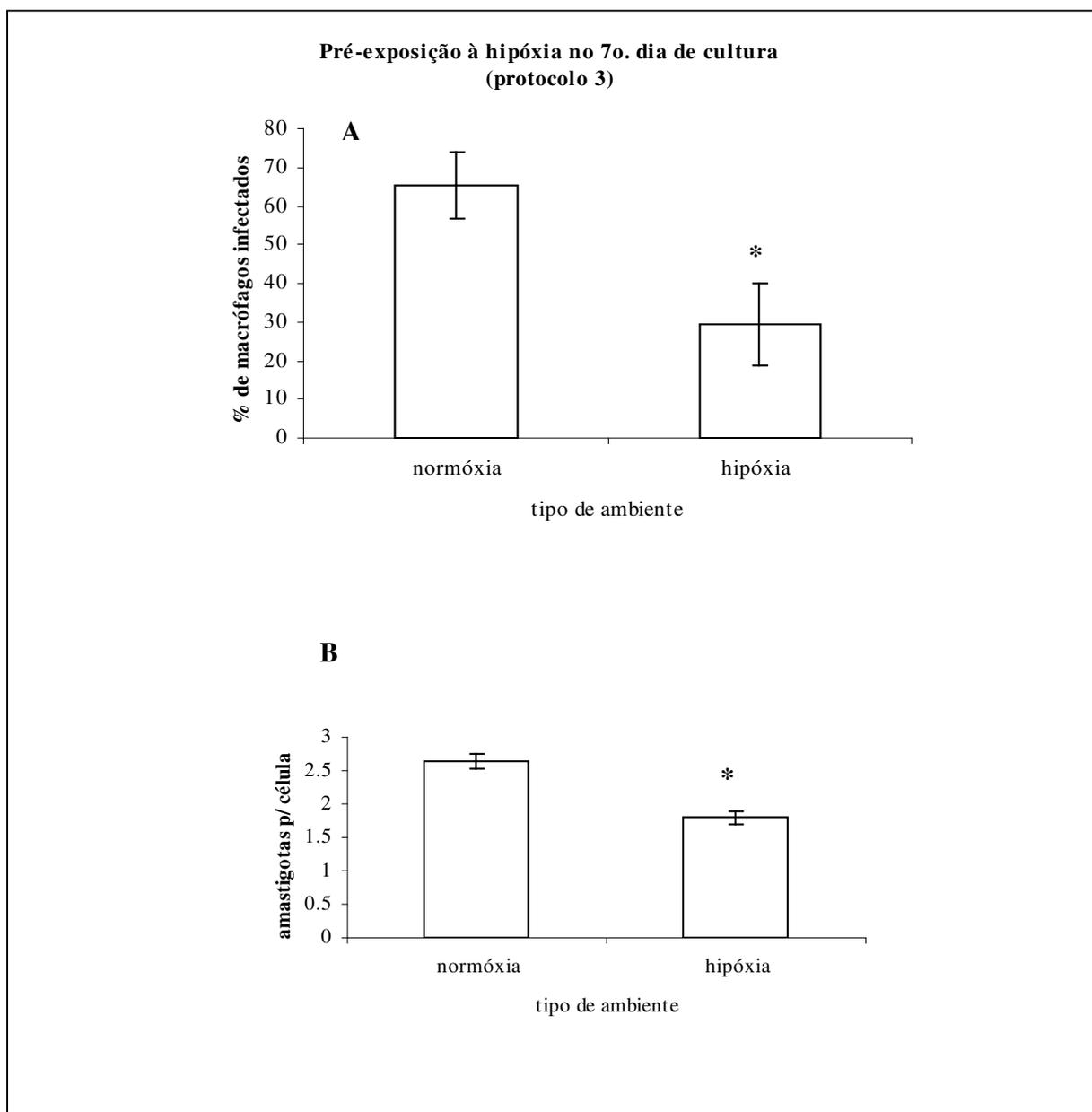


Figura 7: Infecção de macrófagos humanos por amastigotas de *L. amazonensis* em condições de hipóxia e normóxia. : Macrófagos humanos após passarem por período de 24 horas de hipóxia no 7º. dia de cultura foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* no 7º. dia de cultura. (2 amastigotas p/macrófago). A porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas dentro de macrófagos (B) foram avaliados por microscopia ótica. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas e entre o número de amastigotas intracelulares (* $P < 0,05$).

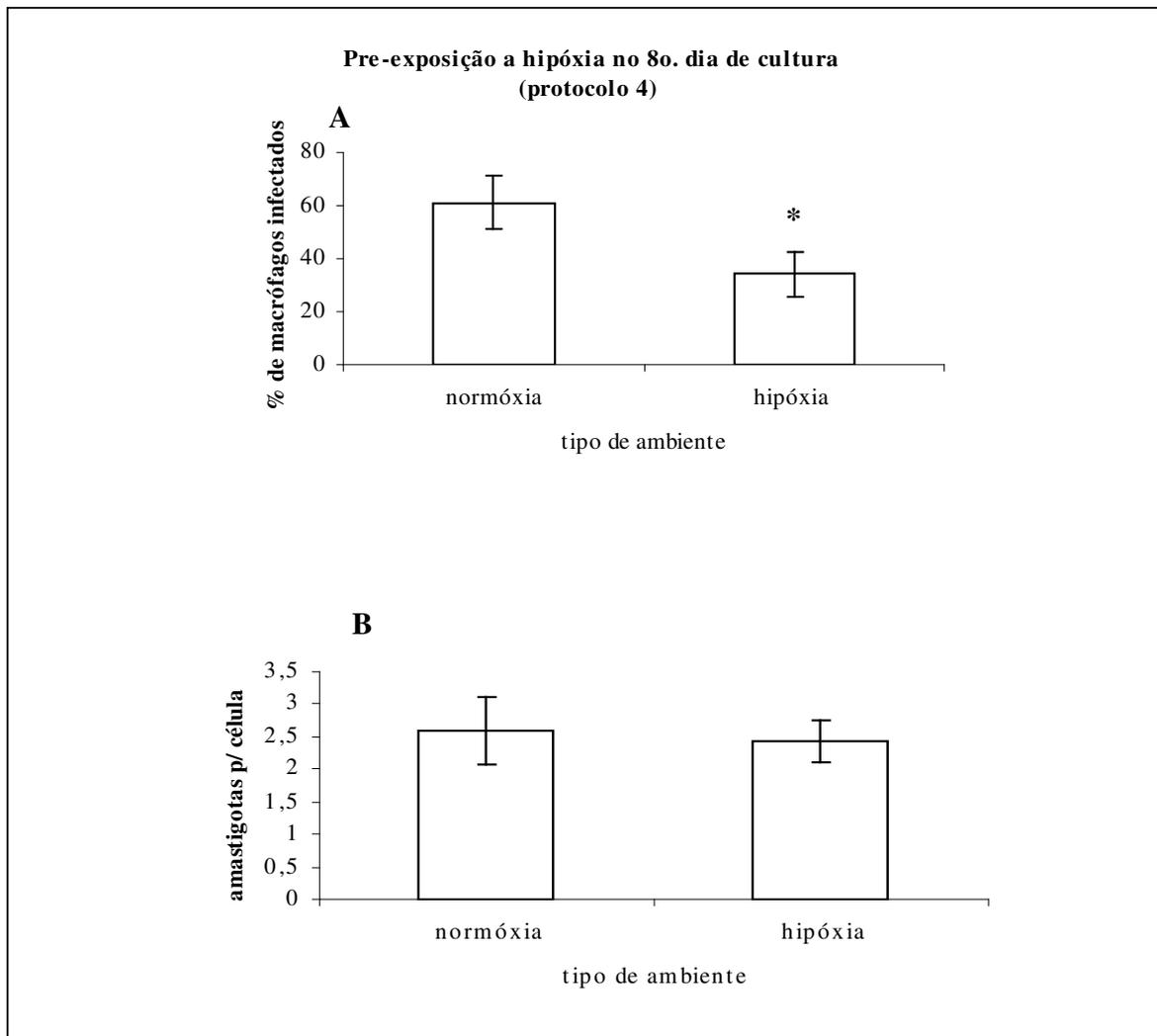


Figura 8: Infecção de macrófagos humanos por amastigotas de *L. amazonensis* em condições de hipóxia e normóxia. : MHP após passarem por período de 24 horas de hipóxia no 8º. dia de cultura foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* no 7º. dia de cultura. (2 amastigotas p/macrófago). A porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas dentro de macrófagos (B) foram avaliados por microscopia ótica. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas (* $P < 0,05$). Não há diferenças significativas entre o número de amastigotas dentro de macrófagos.

O conjunto destes dados e a comparação dos resultados demonstram que nos experimentos nos quais os macrófagos foram infectados após um período de hipóxia (protocolos 2, 3 e 4), a redução da percentagem de células infectadas foi significativa, o que não ocorreu nos macrófagos que foram infectados ao mesmo tempo em que eram expostos à hipóxia (fig. 9).

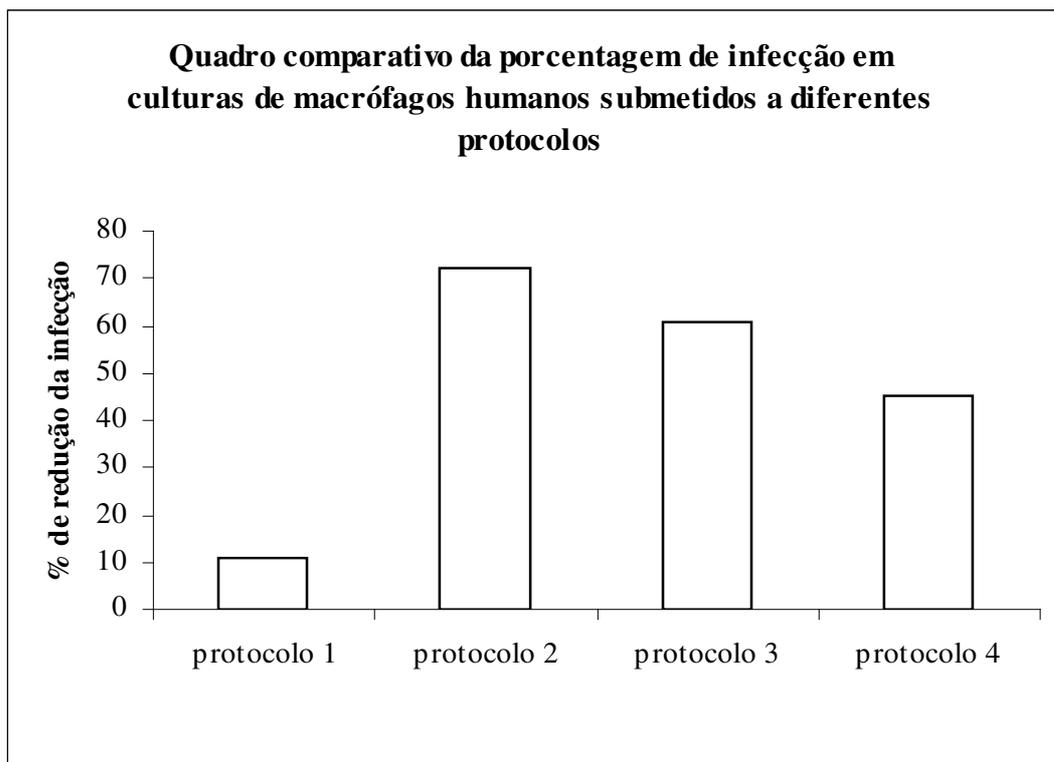


Figura 9 – Percentagem de infecção em culturas de macrófagos submetidos a pré-exposição à hipóxia comparada a percentagem de infecção em culturas de macrófagos infectados durante a exposição à hipóxia: As percentagens de macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis* após passarem por período de 24 horas de hipóxia no 6º, 7º. e 8º. dias de cultura e posteriormente infectados em normóxia (respectivamente protocolos 2, 3 e 4) foram comparadas com as percentagens de macrófagos humanos infectados em ambiente hipóxico com *L. amazonensis* no 7º.

Para avaliar se macrófagos humanos também modificavam o seu comportamento em relação a outros estímulos quando em hipóxia, também avaliamos a fagocitose de “beads” neste ambiente. Macrófagos humanos pré-expostos à hipóxia no 6º. dia de cultura por 24 horas, retirados, e incubados em normóxia com beads, estruturas inorgânicas, fagocitaram cerca de 40% menos “beads” do que macrófagos que permaneceram em normóxia (49,5% das células fagocitaram “beads” em média em normóxia e 31% das células fagocitaram “beads” em média, em hipóxia, fig. 10). As quantidades de “beads” intracelulares por macrófagos foram semelhantes em normóxia e hipóxia (1,5 “beads” em normóxia e 1,3 “beads” em hipóxia, fig. 10).

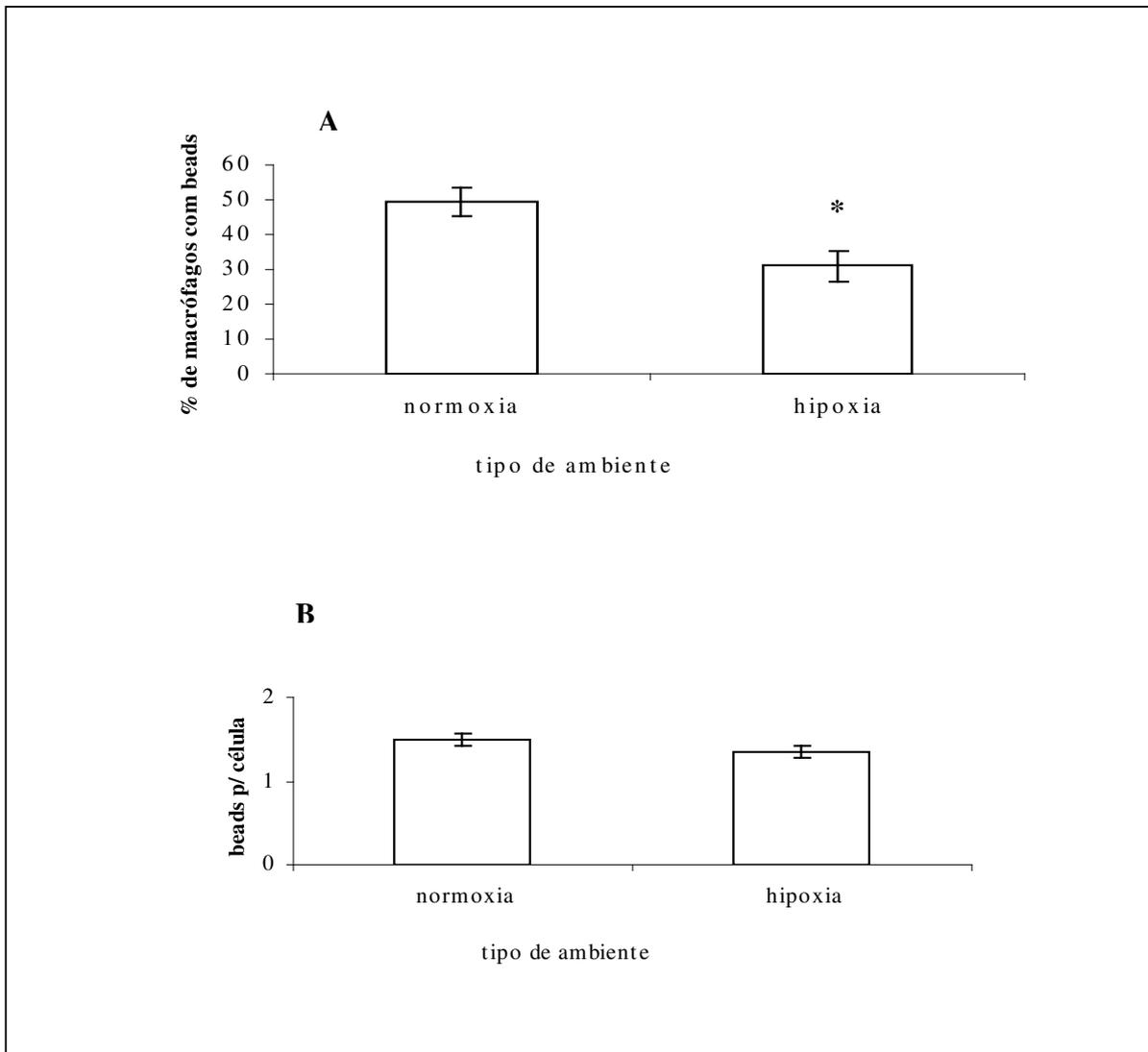


Figura 10 – Porcentagem de beads fagocitados por macrófagos humanos após pré-exposição à hipóxia e em normóxia. : Macrófagos Humanos após passarem por período de 24 horas de hipóxia no 6º. dia de cultura foram infectados com beads de poliestireno no 7º. dia de cultura, na proporção de 1 bead para 1 macrófago. A porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas dentro de macrófagos (B) foram avaliados por microscopia ótica. Diferenças significativas entre condições normóxicas e hipóxicas (* $P < 0,05$). Não há diferenças significativas entre o número de beads dentro de macrófagos.

4.4 Avaliação de Alterações no Meio de Cultura Após a Hipóxia

Os experimentos descritos a seguir tiveram objetivo de avaliar se a hipóxia causou alguma alteração no meio de cultura que provocaria a redução da fagocitose observada em macrófagos submetidos à hipóxia (fig. 6, 7, 8 e 10.)

Para avaliarmos o efeito da hipóxia no meio de cultura, culturas de macrófagos humanos após 6 dias de cultura foram incubadas em hipóxia por 24 horas. Ao serem retiradas da câmara hipóxica e antes de serem infectadas com amastigotas de *L. amazonensis*, culturas de macrófagos humanos tiveram o meio RPMI trocado por outro meio fresco, isto é, que não foi incubado em hipóxia. Estas culturas foram comparadas com culturas de macrófagos humanos em meio RPMI que passaram por período de incubação de 24 horas em ambiente hipóxico no 6º. dia de cultura e não tiveram o meio trocado. As duas culturas foram infectadas por 24 horas.

Observamos que os macrófagos submetidos à hipóxia que tiveram o meio renovado tiveram uma porcentagem de infecção (20,%), praticamente igual à porcentagem de infecção observada nas culturas de macrófagos que não tiveram o meio renovado, (19,%). Ambas (com troca e sem troca de meio) apresentaram diferenças significativas em relação ao controle normóxico (fig. 11A). Não houve diferenças significativas entre as quantidades de amastigotas fagocitados por célula em ambas as situações (fig. 11B).

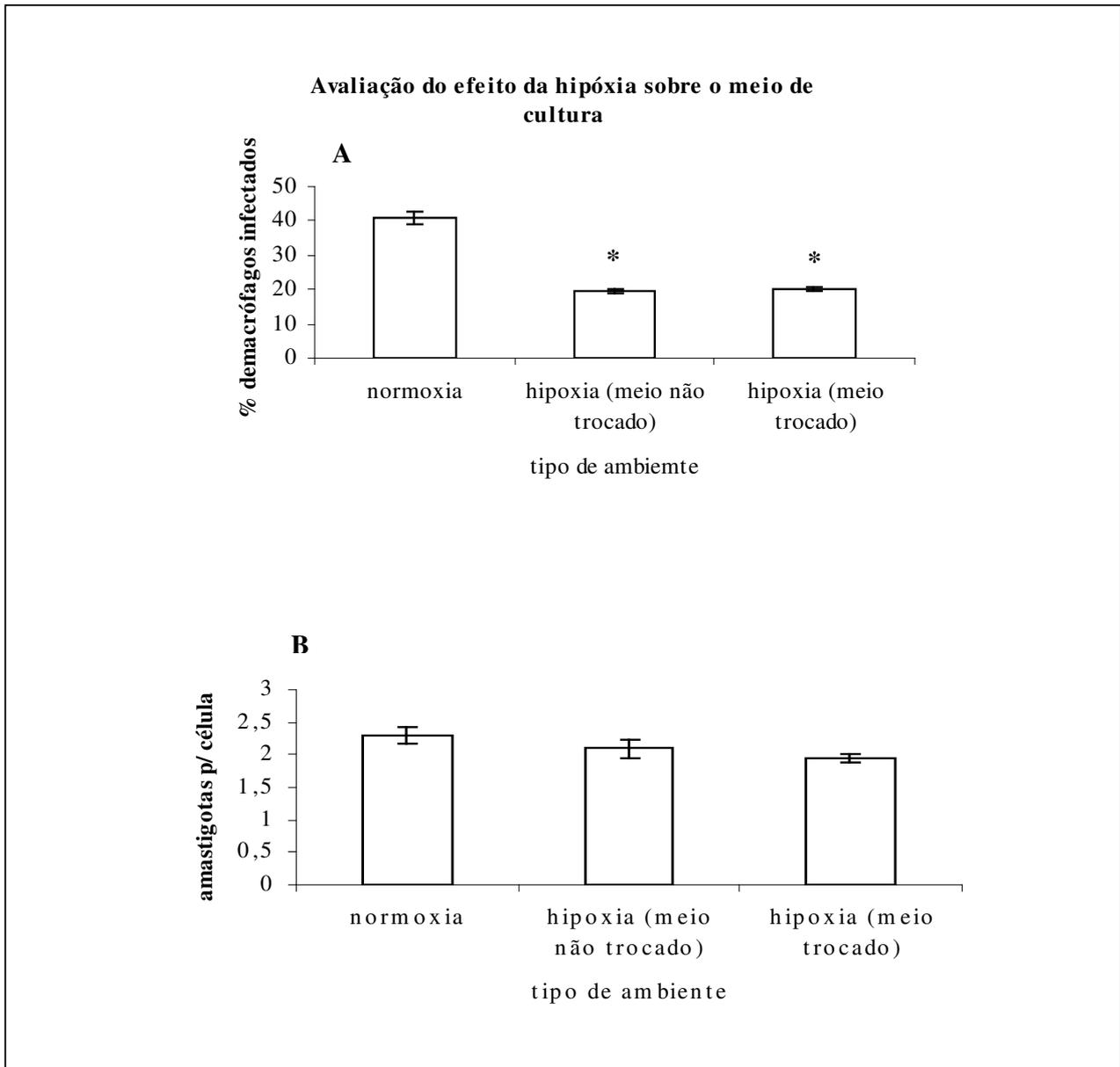


Figura 11: Infecção de macrófagos humanos por amastigotas de *L. amazonensis* em condições de hipóxia e normóxia com troca de meio após a hipóxia : Culturas de macrófagos que ficaram em hipóxia, no 6º. dia de incubação, tiveram o meio trocado por meio fresco, enquanto outro grupo permaneceu com o meio que ficou em hipóxia. Não houve diferença significativa entre as duas culturas, somente entre estas e o controle (* $p < 0,05$). A porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas dentro de macrófagos (B) foram avaliados por microscopia ótica .

4.5 Viabilidade de macrófagos em hipóxia:

Uma possível explicação para a redução da porcentagem de infecção em macrófagos humanos submetidos à hipóxia seria que a diminuição da tensão de O_2 por 24 horas afetaria a viabilidade dos macrófagos. Para determinarmos se a hipóxia influencia a viabilidade dos macrófagos foi realizado o teste de MTT (fig. 12). Os dados mostram que a maioria dos macrófagos permaneceu viável após períodos de 24 horas em ambiente hipóxico, quando comparados com macrófagos que permaneceram em normóxia. Quanto menor o índice de absorbância, maior a mortalidade das células e o controle negativo foi obtido testando as células com H_2O_2 (fig. 12).

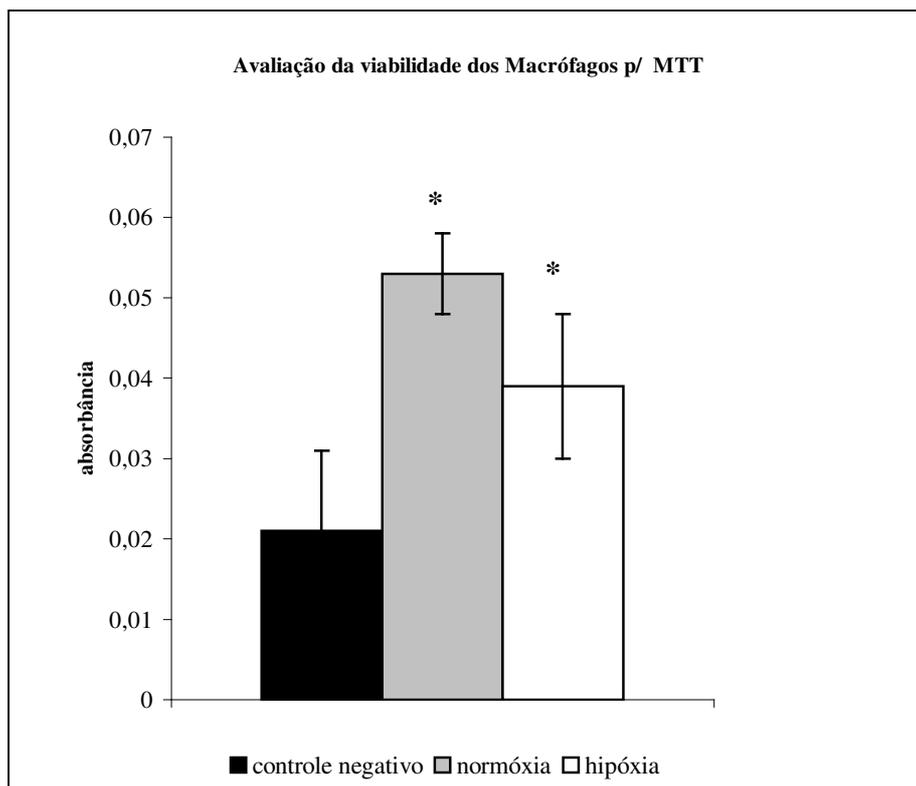


Figura 12: Teste de viabilidade dos macrófagos humanos. Macrófagos humanos após 7 dias de cultura foram submetidos a 24 horas de hipóxia ou 24 horas de normóxia e então submetidos ao teste de viabilidade do MTT. O controle negativo (mortalidade das células) foi obtido incubando os macrófagos humanos com 52 mM de H_2O_2 . (* $P < 0,05$).

4.6 Produção de TNF- α por macrófagos em hipóxia:

Eliminados os fatores meio de cultura e viabilidade celular, uma provável explicação para a diminuição da porcentagem de infecção de macrófagos humanos submetidos à hipóxia seria o aumento da produção de TNF- α (SCANNELL, et al., 1993 e LEEPER-WOODFORD et. al., 1999), citocina que estimula macrófagos a eliminarem amastigotas de *Leishmania* (BOGDAN, et al., 1990). Para verificarmos se nossas culturas submetidas à hipóxia tiveram um aumento significativo na produção de TNF- α , em comparação com as culturas normóxicas, seus sobrenadantes foram testados em culturas de fibroblastos murinos de linhagem tumoral L929, sensíveis ao TNF- α .

Como observado na fig. 13, os sobrenadantes obtidos de macrófagos que permaneceram em ambiente normóxico e estimulados por LPS (1 μ g/ml) produziram um aumento significativo da citotoxicidade em relação aos sobrenadantes de macrófagos que não foram estimulados com LPS. Os sobrenadantes obtidos de culturas normóxicas infectadas com *L. amazonensis* produziram índices de citotoxicidade em células L929 semelhantes aos sobrenadantes das culturas não infectadas e não estimuladas com LPS. As culturas infectadas e estimuladas com LPS não apresentaram diferenças significativas de citotoxicidade em comparação com os sobrenadantes obtidos de culturas infectadas e não estimuladas com LPS (ambas em normóxia, fig. 13). Por outro lado, sobrenadantes obtidos de macrófagos que permaneceram em ambiente hipóxico e foram estimulados por LPS produziram citotoxicidade cerca de 50% maior do que os sobrenadantes de macrófagos não estimulados por LPS sob hipóxia. Os sobrenadantes obtidos de culturas hipóxicas infectadas com *L. amazonensis* não estimuladas com LPS produziram índices de citotoxicidade em células L929 semelhante aos índices de citotoxicidade provocados por

sobrenadantes obtidos de culturas hipóxicas infectadas e estimuladas com LPS (fig. 13). Porém, sobrenadantes destas culturas hipóxicas infectadas, estimuladas ou não com LPS, provocaram um índice de citotoxicidade significativamente menor do que o índice de citotoxicidade causado pelo sobrenadante de culturas hipóxicas estimuladas por LPS e não infectadas com *L. amazonensis* (fig. 13). Os dados indicam que LPS foi um estímulo para produção de TNF- α em hipóxia, e que a infecção por *L. amazonensis* parece ter inibido o efeito do LPS em macrófagos.

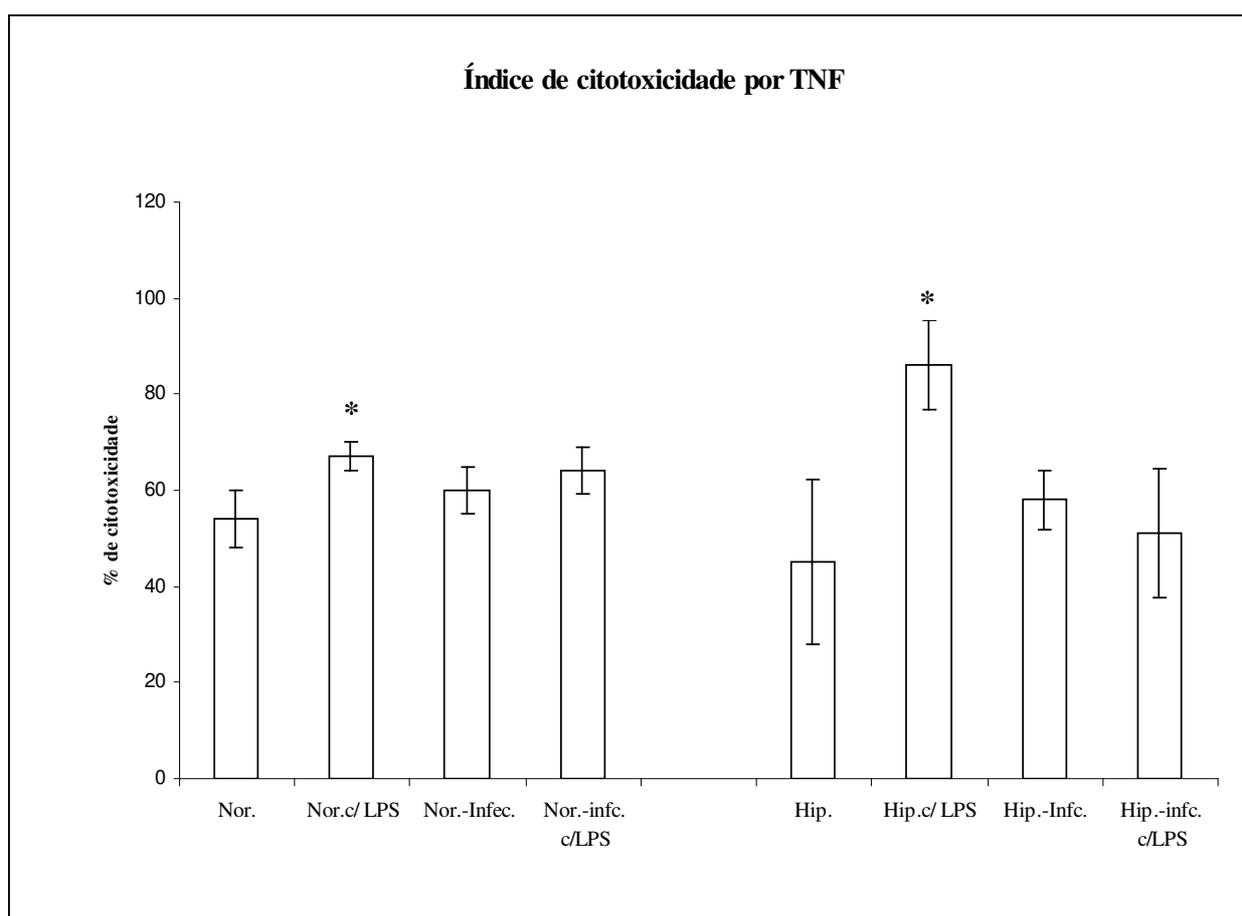


Figura 13: Produção de TNF- α por macrófagos humanos. Células de linhagem tumoral L929 sensíveis ao TNF- α foram incubadas durante 24 horas com sobrenadantes de meio de cultura provenientes de culturas de macrófagos primários humanos submetidos a ambientes hipóxico e normóxico estimuladas ou não com LPS (1 μ g/ml) e infectadas com amastigotas de *L. amazonensis*. A presença de TNF- α foi como descrito em “Materiais e Métodos” (* P < 0,05).

5- Discussão

Nas leishmanioses ocorre inflamação ativa com migração de leucócitos mononucleares, destruição tecidual mediada por células inflamatórias e infecções secundárias causadas por bactérias aeróbicas e anaeróbicas provocando o aparecimento de áreas de baixa tensão de oxigênio (hipóxia), (WEINGLE & SARAIVA, 1996; GIORGIO et al., 1998; ARRAIS-SILVA et al., 2005). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que lesões cutâneas induzidas por *L. amazonensis* expressam marcador de hipóxia HIF-1 α (ARRAIS-SILVA et al., 2005).

Vários estudos têm mostrado que a permanência de células como macrófagos em ambientes com diferentes tensões de oxigênio provoca alterações na capacidade fagocítica, na atividade metabólica, nos marcadores de superfície e na produção de linfocinas (SCANNELL, et al., 1993; ALBINA, 1995; Stuehr, 1997; LEWIS, et al., 1999; LEEPER – WOODFORD, 1999 e MATEO, 2003).

Recentemente Colhone et al. (2004), avaliaram o efeito da hipóxia (*in vitro*) em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*, demonstrando uma redução dos níveis de infecção.

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito da hipóxia em culturas de macrófagos primários humanos infectados com *L. amazonensis*.

O nosso primeiro passo foi a obtenção de culturas de macrófagos humanos primários. Os protocolos foram desenvolvidos pela primeira vez no laboratório durante o nosso trabalho. A obtenção de monócitos humanos de sangue periférico e sua diferenciação *in vitro* para macrófagos seguiram os protocolos de Feldman et al. (1987); Kelley et al. (1988); Kalmar et al. (1988), nos quais foram obtidos culturas com 95% de células mononucleares.

Pesquisadores, como Ho et al. (1992) e Dorta (1997), cultivaram monócitos humanos primários com GM-CSF para otimizar a diferenciação e a estimulação dos monócitos. Em nosso trabalho utilizamos os protocolos de Berman et al. (1979) nos quais a transferência dos monócitos para lamínulas de vidro em placas de cultura por 6 a 7 dias de incubação gera o estímulo necessário para a diferenciação dos monócitos humanos de sangue periférico em macrófagos. Nossos resultados demonstram que após 7 dias de cultura obtivemos uma população de macrófagos (Figs 1 e 2). De fato, a morfologia típica de macrófagos (fig. 1D) e a capacidade fagocítica de “beads” de látex são semelhantes a de macrófagos obtidos por Berman et al. (1979).

Nosso próximo passo foi avaliar a capacidade infectiva de macrófagos humanos. Durante o processo de padronização dos experimentos avaliamos a diferença entre as porcentagens de macrófagos infectados com formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*, as porcentagem de macrófagos infectados com várias proporções de parasito por célula, as diferenças nas porcentagens de macrófagos infectados durante diferentes períodos de tempo (cinética), e a proporção de formas amastigotas intracelulares em macrófagos (carga parasitária). Em nossos experimentos, a porcentagem de macrófagos infectados por formas amastigotas de *L. amazonensis* foi cerca de 30% superior à porcentagem de macrófagos infectados por formas promastigotas (fig. 2). Assim, estabelecemos como padrão para todos os experimentos posteriores, a utilização das formas amastigotas de *L. amazonensis* (fig. 2). Em experimentos utilizando proporções de amastigotas por macrófago acima de 2 ama/célula (fig. 3) verificamos que macrófagos eram altamente infectados (mais que 6 ama/célula). A contagem dos amastigotas ficou prejudicada quando utilizamos mais que 4 ama/célula, o que poderia causar erros nas contagens. Outro problema gerado pelo excesso de amastigotas por célula foi o fato de que

a presença de muitos parasitos dentro dos macrófagos resultavam em lise destas células (20 ou 50 ama/célula).

Em relação aos períodos aos quais os macrófagos permaneceram incubados com as formas amastigotas de *L. amazonensis* (entre 24 e 96 horas, fig. 4), as células incubadas por 24 horas com os parasitos mostraram altas porcentagens de células infectadas e quantidade de amastigotas intracelulares (fig.4). De fato, culturas de macrófagos humanos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* por 24 horas tiveram em média 50% de macrófagos infectados e carga parasitária intracelular de 3 amastigotas por macrófago quando a infecção foi feita na proporção de 2 ama/macrófago. Bermam et al. (1979) utilizando amastigotas de *L. donovani* e de *L. tropica* com protocolos de incubação e de infecção semelhantes aos nossos observaram média de 40% de macrófagos infectados, e cerca de 3 amastigotas por macrófagos. Bosque et al. (1998), observaram porcentagens de infecção em torno de 60% ao realizar incubação com promastigotas de *L. panamensis* em macrófagos humanos primários.

Apesar de observarmos que o número de macrófagos infectados diminuiu ao longo do experimento (fig. 4), o número de amastigotas presentes dentro dos macrófagos permanece constante ao longo das primeiras 72 horas de cultura (fig. 4). Sugerimos que macrófagos muito infectados lisam com o tempo de cultura de 96 horas, o que explicaria a diminuição na porcentagem de células infectadas.

O protocolo mais eficiente para obtenção e manutenção de culturas de macrófagos humanos desenvolvido durante este trabalho foi o seguinte: culturas de macrófagos obtidos de monócitos humanos de sangue periférico após 7 dias de incubação em meio RPMI, incubadas por 24 horas com formas amastigotas na proporção de 2 ama/célula.

Estabelecido este protocolo, nosso próximo passo foi avaliar o comportamento de macrófagos humanos submetidos à hipóxia (6% de O₂, 5% de CO₂, balanceado com N).

A princípio, infectamos os macrófagos humanos no 7º. dia de cultura em normóxia e imediatamente introduzimos as culturas em ambiente hipóxico por 24 horas. Nossos dados não indicaram reduções significantes na porcentagem de macrófagos infectados quando comparada a culturas normóxicas (fig. 5). Culturas de macrófagos humanos obtidas e infectadas da mesma maneira, porém incubadas por mais tempo em hipóxia (48, 72 e 96 horas) também não indicaram reduções significantes na porcentagem de macrófagos infectados quando comparadas a culturas normóxicas (fig. 5). No entanto, em um segundo protocolo, no qual as células passaram por um período de 24 horas em hipóxia, foram retiradas deste ambiente e infectadas em ambiente normóxico, e ali permanecendo por 24 horas, verificamos redução cerca de 70% na porcentagem de macrófagos infectados (figs. 6 e 9). Observamos redução de macrófagos infectados em protocolos similares, nos quais os períodos de hipóxia foram administrados em diferentes dias de cultura. Por exemplo, hipóxia aplicada no 7º. dia de cultura e infecção no 8º. dia em normóxia, por 24 horas resultou em cerca de 60% menos macrófagos infectados quando comparados as culturas normóxicas (figs. 7 e 9). Hipóxia aplicada no 8º. dia de cultura e a infecção durante 24 horas no 9º. dia em normóxia, também resultou em 45% menos macrófagos infectados quando comparadas as culturas normóxicas (figs. 8 e 9). Utilizando outro protocolo similar, aplicando hipóxia no 6º. dia de cultura e incubando os macrófagos humanos com “beads” de poliestireno no 7º. dia em normóxia, durante 24 horas, observamos redução de 40% na porcentagem de macrófagos que fagocitaram “beads” (fig. 10).

Poucos são os trabalhos que relacionam diretamente a hipóxia com a redução da infecção em macrófagos. Peyssomaux et al. (2005) demonstraram que macrófagos estimulados pela hipóxia reduziram a infecção pela bactéria *Staphylococcus aureus* e Colhone et al. (2004) verificaram que em macrófagos murinos peritoniais e linhagens tumorais humana (U937) e murina (J774) infectados com *L. amazonensis* ocorria redução de cerca de 45% da porcentagem de células infectadas em culturas expostas a hipóxia. Degrossoli et al. (2004) também verificaram que culturas de macrófagos murinos peritoniais e de linhagem tumoral J774 infectados com *L. amazonensis* quando submetidos à hipóxia apresentavam redução na porcentagem de células infectadas. Nossos resultados são semelhantes, pois também indicam uma redução significativa de infecção em macrófagos humanos em hipóxia. Os mecanismos envolvidos na redução da infecção em hipóxia não foram analisados por estes autores.

Nosso próximo passo foi avaliar se a redução das porcentagens de infecção não estaria relacionada à diminuição da viabilidade dos macrófagos devido à hipóxia. Para este fim realizamos testes de viabilidade celular. O teste de viabilidade celular MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)- 2,5 diphenyl tetrazolium bromide) avalia a capacidade funcional da mitocôndrias intracelulares através da análise da produção de formazan. Segundo Mosmann (1983), através do teste do MTT é possível diferenciar células vivas de células mortas sendo de ampla aplicabilidade para medidas de sobrevivência e proliferação de várias células. Aplicamos este método para avaliar se os macrófagos humanos submetidos a hipóxia permaneciam viáveis, e os resultados são compatíveis com aqueles obtidos por Degrossoli et al. (2004) e Colhone et al. (2004) e com os dados mostrando que macrófagos se adaptam a ambientes hipóxicos alterando a sua via metabólica para via glicolítica anaeróbia (Lewis, et al., 1999). Não encontramos diferenças significativas entre as

culturas de macrófagos humanos cultivadas em hipóxia e em normóxia (fig. 12), sugerindo que mesmo após períodos de 24 horas em hipóxia as células estavam viáveis. Vale a pena salientar que a morfologia de macrófagos em hipóxia é semelhante a de macrófagos em normóxia.

Uma hipótese aventada para explicar a redução da infecção em macrófagos cultivados em hipóxia seria a de que a baixa tensão de O₂ causaria alterações no meio de cultura. Para testarmos esta hipótese, culturas de macrófagos após 6 dias de cultura foram incubadas 24 horas em hipóxia. Estas foram lavadas, o meio de cultura retirado, os poços repostos com meio fresco (que não passou por hipóxia) e infectadas com amastigotas de *L. amazonensis*. A porcentagem de macrófagos infectados nestas culturas foi comparada com a porcentagem de macrófagos infectados em culturas de 6 dias, incubadas por 24 horas em hipóxia e infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* que permaneceram com o mesmo meio de cultura, ou seja, que ficou em ambiente hipóxico. Não encontramos diferenças significativas entre as porcentagens de macrófagos infectados nestas culturas. (fig.11). Observamos que em ambas as culturas ocorreu redução significativa da infecção quando comparadas as culturas que não passaram por hipóxia (fig. 11). Estes resultados sugerem que o meio de cultura não foi alterado pela baixa tensão de oxigênio, e assim, não foi um fator envolvido na diminuição da infecção por *L. amazonensis* de macrófagos submetidos a ambiente hipóxico.

Conforme já assinalado, os mecanismos responsáveis pela redução da infecção com *L. amazonensis* em hipóxia não foram avaliados anteriormente (DEGROSSOLI et al., 2004; COLHONE et al., 2004). Entre as alternativas para explicar a redução na porcentagem de infecção, sugerimos que macrófagos cultivados em hipóxia estão “ativados” para produzirem substâncias leishmanicidas. Uma possibilidade é que estas

células produzam TNF- α . Scannell et al. (1993) utilizando macrófagos humanos de linhagem tumoral THP-1 verificaram aumento da produção de TNF- α em ambiente hipóxico. Leeper-Woodford et al. (1999) demonstraram que em macrófagos isolados de pulmão de ratos há aumento da secreção TNF- α e IL-1 em hipóxia e Lahat et al. (2003) observaram aumento da produção de TNF- α em macrófagos humanos obtidos de monócitos estimulados com LPS e ativados em hipóxia. Pensamos na possibilidade de que a produção de TNF- α por macrófagos humanos em hipóxia infectados com *L. amazonensis* pudesse estar envolvida na redução da infecção.

De fato, as propriedades leishmanicidas do TNF- α são relatadas nos trabalhos de Liew et al. (1990) e Bogdan et al. (1998). Os autores mostraram que a presença do TNF- α está relacionada com a diminuição de lesões leishmanióticas em patas de camundongos susceptíveis BALB/c e com diminuição na carga parasitária de macrófagos murinos peritoniais *in vitro*.

Em nossos experimentos utilizamos células fibroblásticas de linhagem tumoral L929 sensível à presença de TNF- α . Este bioensaio determina a presença de TNF- α através da citotoxicidade das L929 e foi utilizado por Leeper-Woodford, et al. (1992) para avaliar a produção de TNF- α em macrófagos alveolares em hipóxia. Nossos resultados mostram que sobrenadantes de culturas de macrófagos humanos estimulados com LPS em normóxia apresentam aumento significativo de citotoxicidade para a L929 quando comparados aos sobrenadantes de culturas de macrófagos não estimulados com LPS em normóxia (fig. 13), Em sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados com LPS em hipóxia também houve aumento significativo de citotoxicidade em L929 (cerca de 50% maior do que a de sobrenadantes de células que não receberam LPS, fig 13). Estes dados são semelhantes aos de Lahat et al. (2003) onde foi verificado aumento da produção de TNF- α em macrófagos

humanos primários estimulados com LPS em hipóxia. Os dados indicam que a hipóxia age sinergicamente com o LPS e produz mais TNF- α do que macrófagos em normóxia estimulados com LPS (fig. 13). Nossos resultados também são semelhantes aos de Leeper-Woodford et al. (1999) que observou aumento cerca de 35% na produção de TNF- α em macrófagos alveolares de ratos estimulados por LPS em hipóxia. Avaliamos também a produção de TNF- α em sobrenadantes de culturas de macrófagos sob normóxia e infectadas com *L. amazonensis*, na presença ou não de LPS. Nesse caso, as células infectadas não apresentaram níveis diferentes de TNF- α em relação às células não infectadas (fig. 13). No entanto, sobrenadantes de culturas de macrófagos em hipóxia e infectados com *L. amazonensis* na presença ou não de LPS apresentaram produção reduzida de TNF- α quando comparados aos sobrenadantes de culturas não infectadas em hipóxia. Esses dados sugerem que o TNF- α não está atuando como fator leishmanicida e que sua produção está inibida com a infecção em hipóxia. Assim, a infecção por *L. amazonensis* parece induzir uma diminuição da produção de TNF- α , e no caso do ambiente hipóxico, onde observamos incremento da produção desta linfocina, a redução do TNF- α foi mais evidente. Estes resultados são compatíveis com dados da literatura, pois a ação evasiva de *Leishmania* nos macrófagos já foi relatada. Por exemplo, Passwel et al. (1994), demonstraram a ação inibitória de *Leishmania* no “burst” respiratório, isto é, em diminuição progressiva de mecanismos oxidativos dos macrófagos. Ghalib et al. (1995) e Sartori et al. (1997) relataram que as infecções por *L. donovani* e *L. brasiliensis* não induziram a produção de IL-12 e de TNF- α em macrófagos. De Almeida et al. (2003) relataram efeitos inibitórios causados por *L. donovani* em monócitos humanos de sangue periférico, tais como a inibição da expressão da proteína de superfície CD11b (receptora de LPS e promotora da transcrição do fator transcripcional NF- κ B). Segundo Leeper-

Woodford et al, 1999 macrófagos alveolares sob hipóxia apresentam aumento na produção de NF-kB, o que influenciaria na produção de TNF- α .

Podemos sugerir que a hipóxia é um poderoso estímulo quando associado ao LPS para a produção de TNF- α , porém o parasito intracelular *L. amazonensis* atuou como um inibidor da expressão de TNF- α .

Outros mecanismos leishmanicidas devem atuar em macrófagos cultivados em hipóxia. A produção de intermediários reativos de nitrogênio, espécies descritas como leishmanicida em macrófagos murinos (WILHELM et al., 2005; AWASTHI, et al., 2004;), assim como a produção de intermediários reativos de oxigênio (MURATA, et al., 2002; GREGORY et al., 2005) poderiam estar envolvidos no fenômeno observado neste trabalho.

Foi possível, com os experimentos realizados neste trabalho, demonstrar que macrófagos humanos originados de monócitos periféricos quando cultivados em microambiente hipóxico têm reduzida a sua carga parasitária e que este fenômeno não está relacionado com a mortalidade das culturas de macrófagos. Nós também sugerimos que a produção de TNF- α não estar envolvida nos mecanismos leishmanicidas observados nestes macrófagos.

Este trabalho abre perspectivas para se estudar mais detalhadamente o comportamento dos macrófagos humanos frente à infecção com um parasito intracelular em microambiente de cultura similar ao microambiente encontrado em lesões leishmanióticas e em reações inflamatórias.

6-Conclusões

Podemos concluir que:

1- A hipóxia altera a susceptibilidade de macrófagos humanos ao parasito *L. amazonensis*. Culturas de macrófagos submetidos a períodos de hipóxia (protocolos 2, 3 e 4 do “Materiais e Métodos”) quando comparadas a culturas de macrófagos que permaneceram em normóxia tem uma porcentagem significativamente menor de células infectadas.

2- A hipóxia não altera a viabilidade dos macrófagos humanos. Macrófagos submetidos a períodos de hipóxia quando comparados pelo método do MTT, a macrófagos que permaneceram em ambientes normóxicos apresentaram índices de viabilidade estatisticamente semelhantes.

3- Macrófagos humanos estimulados com LPS submetidos a períodos de hipóxia produzem TNF- α , mas a infecção pelo parasito *L. amazonensis* é um fator de inibição da produção desta linfocina. Culturas de macrófagos estimulados com LPS, submetidos à hipóxia e infectados com amastigotas de *L. amazonensis* mostraram uma produção significativamente menor de TNF- α quando comparadas às culturas de macrófagos estimulados por LPS, em ambiente hipóxico que não foram infectadas. A produção de TNF- α parece não estar envolvida na redução do índice de infecção de macrófagos humanos por *L. amazonensis*.

7-Referências Bibliográficas

- ALBINA, J.E.; HENRY, W.L.JR.; MATROFRANCESCO, B.; MARTIN, B.A.; REICHNER, J.S. Macrophage activation by culture in anoxic environment. **Journal of Immunology** 155: 4391-4396, 1995.
- AMATO, S.V.; ANDRADE JR, H.F.; NETO, V.A.; DUARTE, M.I.S. Persistence of tumor necrosis factor- α *in situ* after lesion healing in mucosal leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68 (5): 527-528, 2003.
- ANTONELLI, L.V.R., DUTRA, W.O.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms of immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology** 136: 341-348, 2004.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science** 18: 2993-3000, 1999.
- ARRAIS-SILVA, W.W.; PAFFARO JR, A.A.; YAMADA, A.T.; GIORGIO, S. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Experimental and Molecular Pathology**. 78: 49-54, 2005.
- AUGUSTO, O.; LINARES, E.; GIORGIO, S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 29(7): 853-862, 1996.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response *Leishmania* infection. **The Indian Journal of Medical Research** 119: 238-258, 2004.
- BARÃO, S.C. Efeito do Imunoestimulador 8BromoGuanosina no Tratamento da Leishmaniose Murina. Tese de Mestrado, **Unicamp**, Campinas, 2001.
- BERMAN, J.D.; DWYER, D.M.; WYLER, D.J. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *In Vito*. **Infection and Immunity** 26: 375-379, 1979.
- BERTHOLET, S. & MAUEL, J. Human monocytic U937 cells transfected with human hepatic inducible nitric oxide synthase exhibit leishmanicidal activity. **Journal of Leukocyte Biology** 67: 34-39, 2000.
- BOGODAN, C. The multiplex functions of nitric oxid in (auto) immunity. **Journal of Experimental Medicine**. 187(9): 1361-1365, 1998a.
- BOGODAN, C.; ROLLINGHOFF M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology** 28(1) 121-134, 1998b.

- BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **European Journal Immunology** 20: 1131-1135, 1990.
- BOSQUE, F.; MILON, G.; VALDERRAMA, L.; SARAIVA, N.G. Permissiveness of human monocytes and monocyte-derived macrophages to infection by promastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis*. **The Journal of Parasitology** 84(6): 1250-1256, 1998.
- CANTOS, G., BARBIERI, C.; IACOMI, M.; GORIN, P.A.; TRAVASSOR, L.R. Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **The Biochemical Journal** 289: 155-160, 1993.
- COLHONE, M.C.; ARRAIS-SILVA, W.W.; PICOLI, C.; GIORGIO S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis* **The Journal of Parasitology** 90(3): 510-515, 2004.
- COX, D.; TSENG, C.; BJEKIC, G.; GREENBERG, S. A requirement of Phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. **The Journal of Biological Chemistry** 274(3): 1240-1247, 1999.
- CUNNINGHAM, A.C. Parasite adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology** 72: 132-141, 2002
- DACOSTA, M.L.; YAO, Z.; MACPHERSON, B.C.; JAYAKAR, D.V.; JEEVANANDAM, V. Brief hypoxia conditions monocytes to protect reperfused cardiocytes against cell death via the CD11b receptor. **The Journal of Heart and Lung Transplantation** 22(9): 979-985, 2003.
- DE ALMEIDA, M.C.; CARDOSO, S.A.; BARRAL-NETTO, M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocytes and macrophages. **International Journal of Parasitology**. 33: 153-162, 2003.
- DEGROSSOLI, A.; COLHONE, M.C.; ARRAIS-SILVA, W.W.; GIORGIO, S. Hypoxia modulates expression of the 70-kD heat shock protein and reduces *Leishmania* infection in macrophages. **Journal of Biomedical Science** 11: 847-854, 2004.
- DING, A.H.; SANCHES, E.; SRIMAL, S.; NATHAN, C.F. Macrophages rapidly internalize their tumor necrosis factor receptors in response to bacterial lipopolysaccharide. **The Journal of Biological Chemistry**. 264(7): 3924-3929, 1989.

- DORTA, Míriam Leandro. Aspectos Moleculares da Infectividade de Formas Tripomastigotas Metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. Tese Doutorado - **Escola Paulista de Medicina**, São Paulo, 1997.
- FELDMAN, D.L. & MOGELESKY, T.C. Use of Histopaque for isolating mononuclear cells from rabbit blood. **Journal of Immunological Methods** 102: 243-249, 1987.
- FLICK, D.A.; GIFFORD, E. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. **Journal of Immunological Methods**. 68: 167-175, 1984.
- GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; MACCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.B; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology** 167(2): 893-901, 2001.
- GHALIB, H.W.; WHITTLE, J.A.; KUBIN, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAM A.M.; GRABSTEIN, K.H.; TRINCHIERI, G.; REED, S. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Immunology** 154(9): 4623-4629, 1995.
- GHERSETICH, I.; MENCHINI, G.; TEOFOLI, P.; LOTT, T. Immune response to *Leishmania* infection in human skin. **Clinics in Dermatology** 17: 333-338, 1999.
- GIORGIO, S.; LINARES, E.; CAPURRO, L.; BIANCHI, A.G.; AUGUSTO, O. Formation nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during leishmaniasis. **Photochemistry and Photobiology** 63(6): 750-754, 1996.
- GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIROPOULOS, H.; VON ZUBEN, F.J.; YAMADA, A.; AUGUSTO, O. *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. **Infection and Immunity** 66: 807-814, 1998.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R.; Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**: 36(1): 71-80, 2003.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S. E.; TANNEBAUM, S.R. Analyze of Nitrate, Nitrite and (¹⁵N) Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry** 126: 131-136, 1984.
- GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the l-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . **The Journal of Immunology** 145: 4290-4297, 1990.
- GREGORY, D.J. & OLIVIER, M. Subversion of host cell signaling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology** 130: 27-35, 2005

- GILDA, E. & STEWART, A. Influence of hypoxia and glucose deprivation on tumor necrosis factor – alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in human cultured monocytes. – **Cellular Physiology and Biochemistry** 8: 75-88, 1998.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews** 14: 229-234, 2001.
- HANDMAN, E. & BULLEM, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology** 18(8) 332-334, 2002.
- HARRON, Z.A.; GREENBERG, C.S.; DEWHIRST, M.W. Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. **Annals of Surgery**. 231: 137-147, 2000.
- HEINZEL, F.P.; SHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSER, L.E.; GATLEY M.K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine** 177: 1505-1509, 1993.
- HEPBURN N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology** 25: 363-370, 2000.
- HEPBURN N.C. Management of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases** 14: 151-154, 2001
- HERWALDT, B. Leishmaniasis. **The Lancet** 354: 1191-1199, 1999.
- HO, J.L.; HE, S.H.; RIOS, M.J.C.; WICK, E.A. Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. **The Journal of Infectious Diseases** 165: 344-351, 1992.
- KALMAR J.R.; ARNOLD, R.R.; WARINGTON, M.L.; GARDNER, M.K. Superior leukocyte separation with a discontinuous one-step Ficoll-Hypaque gradient for isolation of human neutrophils. **Journal of Immunological Methods** 110: 275-281, 1988.
- KELLEY, J.L.; ROZEK, M. M.; SUERAM, C.A.; SCHATZ, C.J. Activation of human peripheral blood monocytes by lipoproteins. **American Journal of Pathology** 130 (2): 233 –231, 1988.
- KLEINERMAN, E.S.; KNOWLES, R.D.; LACHMAN, L.B.; GUTTERMAN, J.U. Effect of recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on human monocyte activity *in vitro* and following intravenous administration. **Cancer Research** 48: 2604-2609, 1988.

- LAHAT, N.; RAHAT M, A.; BALLAN M.; WEISS-CEREM L.; ELGELMAYER M.; BITTERMAN, H. Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF- α secretion. **Journal of Leukocyte Biology** 74: 94-106, 2003.
- LAISON, R. & SHAW, J. **Ciência e Cultura**. 44(2/3): 94-106, 1992 .
- LE KOPPELE, J. M.; KELLER, B.J.; CALDWELL-KENDEL, J.C.; LEMASTRES, J.J. & THURMAN, R.G. Effects of heptotoxic chemicals and hypoxia on hepatic nonparenchymal cells: impairment of phagocytosis by Kupffer cells and disruption of the endothelium in ret livers perfused with colloidal carbon. **Toxicol Appl. Pharmacol.** 110: 20-30, 1991.
- LEEPER-WOODFORD S.K. & DETMER, K. Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF-kB expression. **The American Journal of Physiology** 276: 909-916, 1999.
- LIEW, F.Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. **Immunology** 69: 570-573, 1990.
- LEWIS, J.S.; LEE J.A.; UNDERWOOD J.C.E.; HARRIS A.L.; LEWIS C.E. Macrophages responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology** 66: 889- 900, 1999.
- LINARES, E.; AUGUSTO, O.; BARÃO, S.C.; GIORGIO S. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited lipopolysaccharide *in vivo*. **The Journal of Parasitology**. 86:78-82, 2000
- MATEO, J.; GARCIA-LECEA, M.; CADENAS, S.; HERNANDEZ, C.; MONCADA, S. Regulation of hypoxia inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent an independent pathways. **The Biochemical Journal** 376: 537-544, 2003
- MAUEL J .Intracellular survival of protozoan parasites with special references to *Leishmania ssp.*, *toxoplasma gondii* and *Tripanosoma cruzi*. **Advances in Parasitology**. 38: 1-51, 1996.
- MEAGER, A.; LEUNG, H.; WOOLLEY, J. Assays for tumor necrosis factor and related cytokines. **Journal of Immunological Methods** 116: 1-17, 1989.
- MEHREGAN, D.R.; MEHREGAN, A.H.; MEHREGAN, D.A. Histologic Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology** 17: 297-304, 1999.
- MOLL, H.; BINODER, K.; BOGDAN, C., SOLBACH, W. E.; ROLLINGHOFF M. Production of tumor necrosis factor during murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**. 12: 483-494, 2000.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63, 1983.
- MURATA, Y.; OHTEKI, T.; KOYASU, S.; HAMURO, J. INF- γ and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular redox status regulated by oxygen tension. **European Journal of Immunology** 32: 2866-2873, 2002.
- MURRAY, H.W. Blood monocytes: Differing effector role in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Today** 10(6): 220-224, 1994.
- PASSWELL, J.H.; SHOR, R.; SMOLEN, J.; JAFFE, C.L. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in defective oxidative burst. **International Journal of Experimental Pathology** 75: 277-284, 1994.
- PEARSON, R.D.; ROMITO, R.; SYMES, P.H.; HARCUS, J.L. Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human monocyte-derived macrophages: Parasite entry, intracellular survival and multiplication. **Infection and Immunity**. 32(3): 1249-1253, 1981.
- PEYSSONNAUX, C.; DATTA, V.; CRAMER, T.; DOEDENS, A.; THEODORAKIS, E.A.; GALLO, R.L.; HURTADO-ZIOLA, N.; NIZETE, V.; JOHNSON, R. HIR- α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. **The Journal of Clinical Investigation** 115(7): 1806-1815, 2005.
- RUTAULT, K.; ALDERMAN, C.; CHAIN, B.M.; KATZ, D.R. Reactive oxygen species human peripheral blood dendritic cell. **Free Radical Biology & Medicine** 26: 232-238, 1999.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature** 3 (11): 1041-1047, 2002.
- SARTORI, A.; OLIVEIRA, M.A.P.; SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. **Journal of Immunology**. 159: 2849-2857, 1997.
- SCANNELL, G.; WAXMAN, K.; KAML, G.J.; IOLI, G.; GATANAGA, T.; YAMAMOTO, R.; GRANGER, G.A. Hypoxia induces a human macrophage cell line to release tumor necrosis factor- α and its soluble receptors *in vitro*. **Journal of Surgical Research** 54(4): 281-285, 1993.
- SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIKE, W.; ITOH, Y.; HASEGAWA, J.; YMABE, K.; OTSUKI, Y.; MATSUDA, H.; & TSUJIMOTO, Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. **Cancer Research**. 56(9): 2161-2166, 1996

- SCHÖNLAU, F.; SCHLESIGER, C.; EHERHEN, J.; GRABBE, S.; SORG, C.; SUNDERKÖTTER, C. Monocyte and microphage function in M-CSF-deficient op/op mice during experimental leishmaniasis. **Journal of Leukocyte Biology** 73: 564-573, 2003.
- SOLBACH, W. & LASKAY, T. The host response to *Leishmania major*. **Advances in Immunology** 74: 275-317, 2000.
- STUEHR, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annual Review in Pharmacology and Toxicology** 37: 703-712, 1997.
- YUN, J.K.; MCCORMICK, T.S.; JUDWARE, R.; LAPETINA, E.G. Cellular adaptive responses to low oxygen tension: Apoptosis and resistance. **Neurochemical Research** 22: 517-521, 1997.
- WILHELM, P.; WIEDE, F.; MEISSNER, A.; DONHAUSER, N.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. TNF but not Fas ligand provides protective anti-*L. major* immunity in C57BL/6 mice. **Microbes and Infection** 7(15): 1461-1468, 2005
- WEINGLE, K. & SARAIVA, N.G. Natural history, clinical evolution and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology** 14: 433-450, 1996.
- WEINBERG, J.B.; MISUKONIS, M.A.; SHAMI, P.J.; MASON, S.N.; SAULS, D.L.; DITTMAN, W.A.; WOOD, E.R.L.; SMITH, G.K.; MACDONALD, B.; BACHUS, K.E.; HANEY, A.F.; GRANGER, D.L. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): Analysis of iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood** 86(3): 1185-1195, 1995.